

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
EXPERIMENTAL

**Efeito de três FLA₂S, (BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂), isoladas do veneno
da serpente *Bothrops atrox*, sobre a funcionalidade de macrófagos
J774A.1 em cultura.**

Juliana Loca Furtado

PORTO VELHO

2011

Juliana Loca Furtado

**Efeito de três FLA₂S, (BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂), isoladas do veneno da
serpente *Bothrops atrox*, sobre a funcionalidade de macrófagos
J774A.1 em cultura.**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-graduação em
Biologia Experimental da
Universidade Federal de
Rondônia, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Dra. Juliana Pavan
Zuliani

PORTO VELHO

2011

A DEUS,

Por sua graça e bondade infinitas e pelo amor incondicional, sem o qual
nada seria possível.

Obrigada, pois sei que mesmo nos momentos mais difíceis, quando tudo
parecia perdido, Tu estavas ao meu lado, segurando minha mão e me
ajudando a continuar.

Á Ti seja toda honra e toda glória, pois Tu és o primeiro e o último, o alfa e
o ômega,

O único digno de todo louvor.

Á minha mãe, Maria das Graças,

Amiga, companheira, torcedora e até enfermeira.

Quero dividir com você a alegria desta conquista, pois você é parte dela.

Te amo muito.

Ao meu pai, Aluisio,

Sempre torcendo por mim.

Sei que você sente orgulho de ser meu pai e eu também tenho orgulho de
ser sua filha.

Amo você.

Á minha querida irmã, Daniela,

Sempre ao meu lado.

Você também faz parte deste sonho realizado.

Te amo e te admiro muito.

Ao meu noivo, Fernando,

Que sempre entendeu minha ausência e me apoiou nos momentos difíceis.

Divido com você esta alegria, pois com todo meu coração Te Amo.

A todos vocês dedico este trabalho.

Ao meu irmão, Rodrigo, pelo apoio.

Ao meu cunhado, Alexandre, por sempre ter me acolhido.

Á minha avó, Dona Osória, por simplesmente ser essa pessoa amável e querida.

Ao meu irmão Ruben, sua esposa Érica e minha sobrinha, Isabela, pelo carinho e hospitalidade.

Aos meus irmãos, Márcio e Sandro e

Aos meus primos, Sérgio e Cristiane, por torcerem por mim, mesmo distantes.

Ao meu primo, Burt, por ser como um irmão e sempre atender aos meus pedidos.

Á minha sobrinha, Gabrielly, por sempre demonstrar seu precioso amor.

Ao meu sobrinho, Eduardo, por ter alegrado nossa casa em dias tão difíceis.

Á minha tia, Ivete, por ajudar quando preciso.

A todos vocês, o meu agradecimento.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Á minha orientadora,

Dra. Juliana Zuliani, pela paciência, pela preciosa orientação e por transmitir seu conhecimento e contagiante amor pela pesquisa. Você é extremamente competente e sinto-me honrada por tê-la como orientadora.

Á minha querida amiga Sula, por ter me ensinado e continuar me ensinando. Por me ajudar, sempre que solicitei, e por ser essa pessoa humilde e agradável de conviver. Quanto mais eu te conheço, mais agradeço por ter te conhecido. Sua amizade é preciosa para mim.

Á minha amiga Adriana, com quem tive o privilégio de fazer a faculdade e o mestrado, e que sempre me ajudou. Você é especial.

Á minha amiga Fabi, pelas caronas, pelo apoio e pelos inúmeros momentos de alegria que passei em sua casa. Você conquistou minha admiração.

Á minha amiga Carol, pelo auxílio, amizade e carinho. Você é muito querida.

Á Bia, recém-chegada, pela disponibilidade e determinação em aprender. Por você, tenho um enorme carinho.

Á Neuza, pelas palavras amigas e pelo incentivo.

Á Kayena, pelas caronas e pelos inúmeros cafés-da-manhã que tomei em sua casa.

Á Elis, pelos momentos de descontração e pelo incentivo.

Ao Kayano, pela paciência em ensinar e por sempre estar disponível.

A todos, o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Rodrigo Guerino Stábeli, pelo apoio e inúmeras contribuições durante a realização deste projeto.

Ao Dr. Fábio Kawasnewski, pela doação das células J774 A1.

Ao Dr. Andreimar M. Soares, por ter fornecido as fosfolipases A₂ utilizadas neste estudo.

A todos do Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO), que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Á CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPQ, SEPLAN-RO e ao IPEPATRO, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

“A força não provém da capacidade física e
sim de uma vontade indomável.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

As fosfolipases A₂ (FLA₂) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação acil-éster de fosfolipídios de membranas celulares na posição sn-2, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios. Os produtos desta reação podem, subsequentemente, serem utilizados para a síntese de eicosanóides com funções importantes em reações inflamatórias. No presente estudo investigamos os efeitos *in vitro* de duas miotoxinas básicas, BaTX-I, uma Asp-49 cataliticamente ativa e BaTX-II, uma Lys-49 homóloga inativa, e de uma miotoxina ácida, BaFLA₂, também uma Asp-49 ativa cataliticamente, isoladas do veneno da serpente *Bothrops atrox*, sobre a ativação de macrófagos J774 A.1. Em concentrações não citotóxicas, as três toxinas não afetaram a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos. Apenas a BaTX-II, enzimaticamente inativa, aumentou a fagocitose mediada pelo receptor de complemento. Entretanto, as três toxinas, BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂, induziram aumento na produção de ânion superóxido em macrófagos. Somente a BaTX-II aumentou o volume lisossomal dos macrófagos após 15 minutos de incubação. Aos 30 minutos, as três fosfolipases aumentaram este parâmetro, o que não foi observado no período de 60 minutos. Além disso, as três miotoxinas, BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂, induziram a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos submetidos e não submetidos á fagocitose. Este resultado pode sugerir a função dos corpúsculos lipídicos como um reservatório de mediadores inflamatórios. Ainda, as toxinas BaTX-I e BaFLA₂, foram capazes de aumentar a produção de TNF- α pelos macrófagos no período de 4 horas. A BaTX-II não exerceu este efeito no tempo estudado. Tomados em conjunto, os dados mostraram que, a despeito das diferenças na atividade catalítica, as três toxinas induziram eventos inflamatórios e o caráter ácido ou básico destas enzimas não parece contribuir para estes efeitos.

Palavras-chave: *Bothrops atrox*, FLA₂, macrófagos, inflamação.

ABSTRACT

Phospholipases A₂ (PLA₂) enzymes catalyze the hydrolysis of the Sn-2 ester bonds of phospholipids, releasing free fatty acid and lysophospholipids. The products of this reaction may subsequently be utilized for the synthesis of eicosanoids with important functions in inflammatory reactions. In the present study, we investigated the *in vitro* effects of two basic myotoxins, BaTX-I, an Asp-49 catalytically-active and BaTX-II, a Lys-49 variant, catalytically-inactive and one acidic myotoxin, BaPLA₂, an Asp-49 catalytically-active, isolated from *Bothrops atrox* snake venom, on J774 A1 macrophages activation. At non-cytotoxic concentrations, the three toxins did not affect the adhesion and detachment of macrophages. The obtained data showed that BaTX-II only stimulated complement receptors-mediated phagocytosis. However, BaTX-I, BaTX-II and BaPLA₂ induced the release of superoxide anion by J774 A1 macrophages. Just BaTX-II increased the lysosomal volume of macrophages after 15 min incubation. This parameter was increased by all the phospholipases after 30 min incubation which was not observed for 60 min incubation. Moreover, BaTX-I, BaTX-II and BaPLA₂ increased the number of the lipid bodies on macrophages submitted or not to phagocytosis. This result may suggest the function of lipid bodies as reservoirs of inflammatory mediators. In addition, the toxins BaTX-I and BaPLA₂, were able to increase production of TNF- α by macrophages in the period of 4 hours. The toxin BaTX-II did not exert this effect during the studied period. Taken together, the data showed that, despite differences in enzymatic activity, the three toxins induced inflammatory events and acid or basic characteristics of these enzymes does not appear to contribute to these effects.

Key-words: *Bothrops atrox*, PLA₂, macrophages, inflammation.

Lista de Figuras

Figura 1: Sítio de ligação das FLA ₂	1
Figura 2: Esquema de via biossintética de eicosanóides.....	21
Figura 3: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1.....	31
Figura 4: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a capacidade de adesão e descolamento de macrófagos J774A.1.....	33
Figura 5: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a capacidade fagocítica de macrófagos J774A.1.....	34
Figura 6: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a produção de ânion superóxido em macrófagos J774A.1.....	35
Figura 7: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre volume lisossomal de macrófagos J774A.1.....	37
Figura 8: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1 submetidos ou não á fagocitose.....	39
Figura 9: Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a produção de TNF- α em macrófagos J774A.1.....	40

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação das Fosfolipases A ₂ secretórias.....	4
Tabela 2: Classificação das Fosfolipases A ₂ citosólicas.....	5
Tabela 3: Classificação das Fosfolipases A ₂ cálcio independentes.....	6
Tabela 4: Classificação das PAF-AH.....	6
Tabela 5: Classificação das Fosfolipases A ₂ lisossomais.....	7

Lista de Abreviaturas

AA – ácido araquidônico
CK – creatino quinase
COX – ciclooxigenase
DMSO – dimetil-sulfóxido
EROs – espécies reativas do oxigênio
FLA₂ – fosfolipase A₂
IL-1 – interleucina 1
IL-6 – interleucina 6
INF- γ – interferon gama
LPS – lipopolissacarídio
LTB₄ – leucotrieno B₄
NBT – nitroazul de tetrazólio
NO – óxido nítrico
PAF – fator ativador de plaquetas
PBS – tampão fosfato em salina
PGE₂ – prostaglandina E₂
PMA - acetato de forbol miristato
RPMI – meio de cultura do “Roswell Park Memorial Institute”, Gibco BRL
SFB – soro fetal bovino
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
TXA₂ – tromboxana A₂

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Fosfolipases FLA ₂	1
1.2- Inflamação aguda.....	12
1.3-Papel do macrófago na reação inflamatória.....	14
2-OBJETIVOS.....	24
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1-Macrófagos J774A.1.....	25
3.2-Fosfolipases A ₂	25
3.3-Ensaio de citotoxicidade.....	25
3.4-Ensaio de adesão.....	26
3.5-Ensaio de descolamento.....	26
3.6-Determinação da fagocitose por macrófagos.....	27
3.6.1- Obtenção do zimosan opsonizado com soro de camundongo normal.....	27
3.7-Determinação da produção do ânion superóxido em lâmina.....	27
3.8-Corpúsculos lipídicos.....	28
3.9-Determinação do volume lisossomal.....	28
3.10-Dosagem de TNF- α	29
3.11-Análise Estatística.....	30
4-RESULTADOS.....	31

4.1- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1.....	31
4.2- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a capacidade de adesão e descolamento de macrófagos J774A.1.....	32
4.3-Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a capacidade fagocítica de macrófagos J774A.1, via receptor de complemento.....	34
4.4-Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a produção de superóxido por macrófagos J774A.1.....	35
4.5- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre o volume lisossomal dos macrófagos J774A.1.....	36
4.6- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1, submetidos ou não á fagocitose.....	38
4.7- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaPLA ₂ sobre a produção de TNF- α em macrófagos J774A.1.....	40
 5-DISCUSSÃO.....	 41
 6-CONCLUSÕES.....	 49
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 51
 ANEXOS.....	 75

1-INTRODUÇÃO

1.1- Fosfolipases A₂ (FLA₂s)

As fosfolipases A₂ (FLA₂s) ou fosfatidilcolina-2-acil-hidrolases representam diferentes grupos de enzimas lipolíticas caracterizadas pela sua capacidade de catalisar especificamente a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de glicerofosfolipídios de membrana (BURKE & DENNIS, 2009).

R1 e R2 – cadeias de ácidos graxos

Fosfolipase A₂

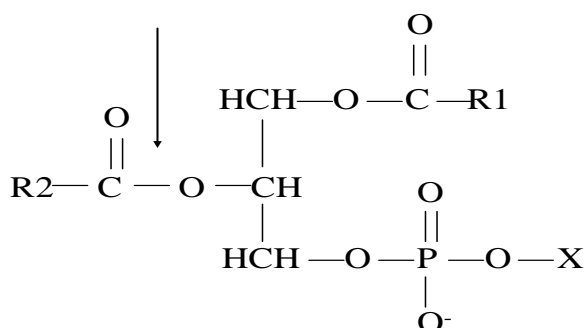


Figura 1. Sítio de ligação das fosfolipases A₂. (Adaptado de KINI, R. M. Venom phospholipase A₂ enzymes: Structure, function and mechanism, p.1, 1997).

A reação de hidrólise das ligações acil-éster de fosfolipídios é dependente de íons cálcio. Os resíduos que participam da alça de ligação para os íons cálcio nas FLA₂ são a Tyr 28, Gly 30, Gly 32 e Asp 49 (FREMONT *et al*, 1993). A unidade catalítica é composta por uma molécula de água e também pelos aminoácidos His 48 e Asp 99. Os produtos gerados a partir desta reação são ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. Ambos os

produtos representam o primeiro passo para a geração de importantes segundos mensageiros com diversas funções fisiológicas. O ácido araquidônico (AA), principal ácido graxo liberado desta reação, pode ser convertido em eicosanóides através da ação de uma variedade de enzimas. Estes eicosanóides exercem efeitos fisiológicos e patológicos, sendo potentes mediadores inflamatórios e auxiliando na transdução de sinais (DENNIS, 1994; 1997; KINI, 1997; MURAKAMI *et al.*, 1995). A atividade catalítica de FLA₂ leva, adicionalmente, à produção do lisofosfolípídio liso-PAF, também importante para a sinalização celular, remodelamento de fosfolipídios e perturbações de membrana (SIX & DENNIS, 2000). Este pode ser convertido em ácido liso-fosfatídico ou em fator ativador de plaquetas (PAF), um mediador inflamatório importante, que induz a agregação plaquetária (QUIN *et al.*, 1998). Os derivados do ácido araquidônico e o PAF são mediadores de diversos fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (LENNHARTZ, 1999; MURAKAMI *et al.*, 1995; VISHWANATH *et al.*, 1987). Por catalisarem essas reações, as fosfolipases possuem importantes funções em vários processos biológicos incluindo homeostasia de membranas celulares, digestão de lipídios, defesa do hospedeiro, transdução de sinais e produção de mediadores lipídicos (VALENTIN & LAMBEAU, 2000).

Quanto a classificação, estas enzimas foram, inicialmente, divididas em dois grupos: as FLA₂s extracelulares ou de baixo peso molecular (14-18 kDa), também denominadas de FLA₂s pancreáticas ou secretadas (sFLA₂s) e as FLA₂ intracelulares, de alto peso molecular (31-110 kDa), de origem citosólica (cFLA₂ e iFLA₂). Em seguida, estas enzimas foram divididas em cinco grupos: as FLA₂ secretórias (sFLA₂s), com baixo peso molecular e dependentes de cálcio, as FLA₂s intracelulares citosólicas (cFLA₂) dependentes de cálcio, as FLA₂s independentes de cálcio (iFLA₂), as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (DENNIS, 1994; MURAKAMI, *et al.*, 1997) e as FLA₂ lisossomais (ABE & SHAYMAN, 1998).

Levando-se em consideração características bioquímicas, tais como localização celular, sequência de aminoácidos, especificidade de substrato, peso molecular, presença de pontes dissulfeto intramoleculares e dependência de cálcio para a atividade enzimática (SIX & DENNIS, 2000), estas FLA₂s estão, atualmente, subdivididas em 15 grupos (I-XV) (BROWN *et al.*, 2003; BALSINDE *et al.* 2002; BURKE & DENNIS, 2009).

As fosfolipases secretórias possuem baixo peso molecular (12 KDa a 55 KDa), contêm 6 ligações dissulfeto conservadas, com uma ou duas ligações dissulfeto variáveis adicionais, possuem resíduos de histidina no sítio ativo e dependência do cálcio para o processo de catálise (DENNIS, 1994). Estas enzimas estão classificadas nos grupos I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII e XIV, como demonstrado pela tabela 1. O grupo I compreende enzimas secretadas que são encontradas em venenos de serpentes das Famílias Elapidae e Hydrofiidae, além de serem altamente expressas em suínos, bovinos, no suco pancreático de humanos e em outros tecidos de mamíferos. O grupo II, também conhecido como grupo das FLA₂s inflamatórias, compreende as fosfolipases originalmente encontradas nos venenos de serpentes, principalmente da família Viperidae. Estas enzimas também estão presentes em altas concentrações nas plaquetas e no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, sendo consideradas proteínas de fase aguda. Ainda, este grupo tem sido altamente implicado na síntese de eicosanóides em mamíferos (RIZZO *et al.*, 2000; MURAKAMI *et al.*, 1995; VALENTIN *et al.*, 1999). O grupo III compreende as sFLA₂s encontradas em águas vivas e em venenos de abelhas, de escorpiões e de lagartos do gênero *Heloderma*, apresentando algumas características bioquímicas similares aos grupos I e II. O grupo V, por sua vez, contém as FLA₂s expressas em tecidos como coração e pulmão de mamíferos, principalmente humanos e camundongos, em resposta a estímulos inflamatórios (SAWADA *et al.*, 1999). O grupo IX é constituído pela sFLA₂ denominada conodipina M, que foi purificada e caracterizada do veneno do caracol marinho *Conus magus*. Este grupo de sFLA₂ requer baixas concentrações de cálcio para sua atividade, sendo um grupo bastante distinto (McINTOSH, 1995). O grupo X compreende FLA₂s encontradas em leucócitos, células endoteliais alveolares e no timo e no baço de humanos (HANASAKI, 1999). Já o grupo XI é constituído por FLA₂s presentes em plantas como o arroz e o cravo (SIX & DENNIS, 2000). As sFLA₂ do grupo XII são localizadas nos músculos cardíaco e esquelético, nos rins e pâncreas de mamíferos (MURAKAMI & KUDO, 2002). As sFLA₂ do grupo XIII são encontradas em vírus e as sFLA₂s do grupo XIV estão presentes em fungos simbióticos e bactérias (SIX & DENNIS, 2009).

Tabela 1. Classificação das FLA₂ secretórias (SIX & DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTE	TAMANHO (KDa)
<i>IA</i>	<i>Venenos ofídicos- Elapidae e Hydrophidae</i>	<i>13-15</i>
<i>IB</i>	<i>Pâncreas de mamíferos</i>	<i>13-15</i>
<i>IIA</i>	<i>Fluido sinovial humano, plaquetas, venenos ofídicos: Viperidae</i>	<i>13-15</i>
<i>IIB</i>	<i>Venenos ofídicos- Viperinae</i>	<i>13-15</i>
<i>IIC</i>	<i>Testículos de ratos e camundongos</i>	<i>15</i>
<i>IID</i>	<i>Pâncreas e fígado de rato/humano</i>	<i>14-15</i>
<i>IIE</i>	<i>Útero, coração, cérebro de rato/humano</i>	<i>16-17</i>
<i>IIF</i>	<i>Embrião e testículos de rato</i>	<i>14</i>
<i>III</i>	<i>Venenos de abelhas, vespas e escorpião e em humanos</i>	<i>15-18</i>
<i>V</i>	<i>Pulmão, coração de mamíferos, macrófagos</i>	<i>14</i>
<i>IX</i>	<i>Molusco marinho Conus Magno (Conodipina-M)</i>	<i>14</i>
<i>X</i>	<i>Baço, timo, leucócitos humanos, testículos e estômago de ratos</i>	<i>14</i>
<i>XIA</i>	<i>Vegetal (arroz verde-FLA₂I)</i>	<i>12.4</i>
<i>XIB</i>	<i>Vegetal (arroz verde-FLA₂II)</i>	<i>12.9</i>
<i>XII</i>	<i>Coração, rins e pâncreas</i>	<i>18.7</i>
<i>XIII</i>	<i>Parvovírus</i>	<i><10</i>
<i>XIV</i>	<i>Fungos</i>	<i>13-19</i>

As FLA₂s intracelulares citosólicas (cFLA₂s), por sua vez, são maiores que as secretórias (61-114 KDa) e não possuem nenhuma ponte dissulfeto. As primeiras cFLA₂s foram isoladas de neutrófilos e plaquetas em 1986 (BURKE & DENNIS, 2000). Estas enzimas são encontradas em mamíferos e estão classificadas no grupo IV, como mostra a tabela 1.2 (DENNIS, 1994). As cFLA₂s são ativadas por concentrações submicromolares de íons cálcio e também por fosforilação (LIN *et al.*, 1993). As enzimas deste grupo têm sido implicadas em uma variedade de modelos de doenças inflamatórias, tais como encefalomielite autoimune, injúria aguda do pulmão e artrite induzida por colágeno. Além disso, a liberação do ácido araquidônico, apesar de ter a participação de FLA₂s do grupo II, é primariamente associada ao grupo IV das FLA₂s citosólicas (GOSH *et al.*, 2006; NAGASE *et al.*, 2000).

Tabela 2. Classificação das FLA₂ citosólicas (SIX & DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTE	Tamanho (KDa)
<i>IVA</i>	<i>Células U937 humanas, plaquetas, Rim de rato (cFLA₂α)</i>	<i>85</i>
<i>IVB</i>	<i>Pâncreas, fígado, coração, cérebro humano (cFLA₂β)</i>	<i>114</i>
<i>IVC</i>	<i>Coração, músculo esquelético humano (cFLA₂γ)</i>	<i>61</i>

O grupo VI é o das FLA₂s independentes de cálcio (iFLA₂s) e inclui seis diferentes tipos (GVIA a GVIF). Todas as enzimas deste grupo não necessitam do cálcio para sua atividade e possuem o aminoácido serina em seu sítio catalítico (DENNIS, 1994). Além disso, a família das iFLA₂s possui um papel importante no remodelamento dos fosfolípidos de membrana e estão envolvidas no processo de fagocitose (BALSINDE *et al.*, 1995). A tabela abaixo exemplifica as enzimas deste grupo.

Tabela 3. Classificação das FLA₂ independentes de Cálcio (SIX & DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTE	Tamanho (KDa)
<i>VIA</i>	<i>Macrófagos P388D1, CHO, Linfócitos B, testículos (iFLA₂αβ)</i>	84-90
<i>VIB</i>	<i>Coração, músculo esquelético humano (iFLA₂γ)</i>	88

As acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), são compostas por dois grupos de enzimas (VII e VIII) que hidrolisam o grupo acetil da posição *sn*-2 do fator ativador de plaquetas, como está demonstrado na tabela 1.4. A função dessa classe de enzimas é altamente interessante devido às importantes funções do PAF no organismo, tais como aumento da permeabilidade vascular, agregação plaquetária e quimiotaxia. Ambos os grupos de PAF-AH não necessitam do cálcio para desempenhar sua função (SIX & DENNIS, 2000; BALSINDE *et. al.*, 1999).

Tabela 4. Classificação das PAF-AH (SIX & DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTE	Tamanho (KDa)
<i>VIIA</i>	<i>Plasma bovino, porcino, murino e humano (PAF-AH)</i>	45
<i>VIIIB</i>	<i>Rins, fígado humano/bovino (PAF-AH (II))</i>	40
<i>VIIIA</i>	<i>Cérebro humano (PAF-AHIba1)</i>	26
<i>VIIIB</i>	<i>Cérebro humano (PAF-AHIba2)</i>	26

O último grupo (XV) é o das FLA₂s lisossomais (tabela 1.5). Estas enzimas estão presentes nos lisossomos, e foram purificadas a partir do cérebro de bovinos, sendo caracterizadas como glicoproteínas solúveis em água. Estas enzimas também são altamente

expressas em macrófagos alveolares e também são independentes de cálcio (ABE & SHAYMAN, 1998; 2006).

Tabela 5. Classificação das FLA₂ lisossomais (SIX & DENNIS, 2000).

GRUPO	FONTE	Tamanho (KDa)
<i>XV</i>	<i>Humanos, murinos e bovinos</i>	<i>45</i>

Por causa da sua capacidade de liberar AA e lisofosfolipídios, tem sido demonstrado que as FLA₂s participam de uma grande variedade de doenças, como aterosclerose e câncer, nas quais os mediadores lipídicos apresentam funções essenciais (UOZUMI *et al.*, 1997). O papel das FLA₂s na gênese de diversas patologias de origem inflamatória tem sido amplamente demonstrado. Estudos realizados deixaram evidente a participação destas enzimas no choque séptico. Este efeito foi observado em experimentos com animais, nos quais camundongos deficientes em receptor de FLA₂ demonstraram maior resistência ao choque do que camundongos selvagens (HANASAKI *et al.*, 1997). Em outro estudo, pacientes com doença inflamatória de Bowel (IBD) tiveram índices aumentados de síntese de prostaglandinas e leucotrieno B₄ na mucosa intestinal. Isto sugere, mesmo que indiretamente, a participação de FLA₂s no processo inflamatório desta doença. Estudos experimentais com colite induzida em ratos também sugerem a participação de FLA₂s na inflamação intestinal (FÁBIA *et al.*, 1993). Estas enzimas também participam de desordens imunológicas como a artrite reumatóide e doença de Crohn (HAAPAMAKI *et al.*, 1998; 1999; LIN *et al.*, 1996), além da asma brônquica e da rinite alérgica (CHILTON *et al.*, 1996; STADEL *et al.*, 1994). A atividade de FLA₂s também aparece aumentada no lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome do desconforto respiratório do adulto (ARDS) e pneumonia brônquica, indicando que estas enzimas constituem um fator importante em doenças pulmonares com características inflamatórias (VADAS & PRUZANSK, 1986; KIM *et al.*, 1995). O envolvimento das sFLA₂s no processo inflamatório da artrite reumatóide e da asma, está bem estabelecido. Esses

estudos foram realizados, em grande parte, em modelos animais, pela administração de FLA₂s purificadas (VADAS & PRUZANSK, 1986). Nesses estudos foram detectadas altas concentrações de FLA₂s no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e no plasma de pacientes com síndrome torácica aguda (BOWTON *et al.*, 1997; KUNDU *et al.*, 1997). Níveis circulantes destas enzimas também estão drasticamente aumentados nos fluidos corporais de indivíduos com pancreatite aguda (HIETARANTA *et al.*, 1999; MAKELA *et al.*, 1990). O fluido de pseudocistos pancreáticos humanos, que evoluíram pouco depois de um ataque de pancreatite aguda, apresentou alta atividade de FLA₂ dependente de cálcio, levando à ativação de tripsina (GOKE *et al.*, 1989). Em pacientes com pancreatite aguda necrotizante, níveis elevados de FLA₂s foram encontrados no líquido ascítico (HIEFINGER-SCHINDLBECK, *et al.*, 1993). A participação de FLA₂s na inflamação associada à liberação de mediadores lipídicos foi demonstrada em estudos relacionados à peritonite induzida por zimosan (SATAKE *et al.*, 2004), hipersensibilidade de vias aéreas induzida por metacolina (MUÑOZ *et al.*, 2007), resposta asmática baseada em TH₂ (FUJIOKA *et al.*, 2008) e isquemia de reperfusão induzida por dano miocárdico (HENDERSON *et al.*, 2007). Outros estudos demonstraram que sFLA₂ do grupo IIA protegem o hospedeiro contra a invasão de microorganismos através da degradação das membranas bacterianas que apresentam fosfatidil-glicerol e fosfatidil-etanol-amina como seus principais componentes. Neste caso, a enzima destrói principalmente bactérias Gram-positivas (*in vitro*). Também foi evidenciado que camundongos transgênicos que expressam altos níveis de sFLA₂ do grupo IIA, sobrevivem mais à infecções causadas por *Staphylococcus aureus* do que camundongos selvagens (LAINE *et al.*, 1999; QU & LEHRER, 1998; WEINRAUCH *et al.*, 1996). Adicionalmente foi demonstrado que as FLA₂ estão envolvidas na maturação das células dendríticas, contribuindo para a regulação das respostas imunológicas (RAMONER *et al.*, 2005) e na função das células T regulatórias (Tregs), suprimindo a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ (Von ALLMEN *et al.*, 2009). Essas observações implicam que tanto a inflamação local quanto a sistêmica estão associadas à liberação de sFLA₂s *in vivo*, emergindo, assim, a questão, não esclarecida do papel dessas enzimas em reações inflamatórias. A expressão de sFLA₂s é marcadamente induzida por estímulos próinflamatórios e regulada negativamente por citocinas antiinflamatórias e glicocorticóides (OKA & ARITA, 1991). SCHALKWIJK *et al* (1991) e

BECK *et al* (2003) demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e o TNF- α , induzem a transcrição gênica de fosfolipases e o subsequente aumento da secreção dessas enzimas, o que reforça a participação das mesmas em processos inflamatórios. Ainda, evidências clínicas indicam a participação das FLA₂s na resposta do hospedeiro ao trauma tanto em níveis locais quanto em níveis sistêmicos. O nível sérico destas enzimas pode ser utilizado como marcador de severidade da resposta inflamatória sistêmica e até mesmo prevenir a falência múltipla de órgãos em pacientes com múltiplos traumas (TAKAKUWA *et al.*, 1997). Assim, o papel central da FLA₂ durante a inflamação faz desta enzima um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas que visem reduzir efeitos próinflamatórios.

No que se refere ao mecanismo catalítico e de ativação das sFLA₂s, é conhecido que essas enzimas são semelhantes às serino-proteases, porém possuem uma molécula de água em seu sítio nucleófilo. Os aminoácidos importantes para a atividade catalítica são a His 48, que atua como agente catalisador ácido-básico, sendo estabilizada por pontes de hidrogênio associadas ao Asp 99, além da Gly 30 e do Asp 49, que participam da alça de ligação ao cálcio (SCOTT *et al.*, 1990; 1991; KUIPERS *et al.*, 1990; THUNNISSEN *et al.*, 1990; WERY *et al.*, 1991).

Atualmente, são descritos dois tipos de sFLA₂s isoladas a partir de venenos botrópicos. O primeiro tipo é composto pelas sFLA₂s que contêm um aminoácido aspartato na posição 49, denominadas de sFLA₂s-Asp49, também conhecidas como clássicas. O segundo tipo compreende as sFLA₂s descritas como variantes que contêm uma lisina na mesma posição 49, sendo denominadas de sFLA₂s-Lys49. As sFLA₂s-Asp49 catalisam, de maneira dependente de cálcio, a hidrólise da ligação acil-éster, na posição *sn*-2 de glicerofosfolipídeos. Já as sFLA₂-Lys49 possuem pouca ou nenhuma capacidade catalítica (SOARES *et al.*, 2004; OWNBY *et al.*, 1999). A presença de um resíduo de aspartato na posição 49 é crucial para a ligação destas enzimas ao cálcio, favorecendo sua atividade catalítica (OWNBY *et al.*, 1999). A substituição do aminoácido Asp por Lys, na posição 49, afeta drasticamente a capacidade de ligação destas sFLA₂s ao íon cálcio, cofator essencial para a estabilização do intermediário tetraédrico, no mecanismo catalítico (VAN DEN BERGH *et al.*, 1988; SCOTT *et al.*, 1990). Apesar de sua baixa atividade catalítica, as sFLA₂-Lys49 são capazes de afetar a integridade das membranas celulares e provocar

acentuada liberação dos lipossomos (DÍAZ, *et al.*, 1991; OLIVEIRA, *et al.*, 2001). Estudos têm demonstrado que uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos na região C-terminal destas fosfolipases é essencial para suas atividades miotóxica, bactericida e sobre lipossomos (LOMONTE *et al.*, 2003; AMBRÓSIO *et al.*, 2005).

De um modo geral, a ativação das fosfolipases depende das suas interações com grandes agregados lipídicos, em interfaces lipídio/água, o que permite a difusão do substrato para o sítio ativo. Essas interações têm sido investigadas através da utilização de fosfolipases pancreáticas e de venenos, visto que estas enzimas podem ser encontradas em fluidos e tecidos de mamíferos e também em altas concentrações em venenos de serpentes, abelhas e vespas (HARRIS, 1991).

As sFLA₂s têm sido amplamente estudadas devido à sua capacidade de hidrolisar fosfolipídios de membrana, levando à formação de derivados do AA e do PAF. Dados da literatura mostram que estes mediadores lipídicos, derivados do ácido araquidônico, estão envolvidos na resposta inflamatória local induzida por venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (BURIGO *et al.*, 1996; CHAVES *et al.*, 1995; FARSKY *et al.*, 1997; TREBIEN & CALIXTO, 1989; BARBOSA, 2003). Mediante à grande quantidade de isoformas de FLA₂s encontradas nesses venenos (LOMONTE & CARMONA, 1992; VALIENTE *et al.*, 1992), sugere-se a participação das mesmas nos efeitos inflamatórios locais por eles induzidos (LANDUCCI *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2005). A literatura mostra ainda que as sFLA₂s de venenos apresentam uma grande variedade de atividades fisiopatológicas, que incluem ação hemolítica indireta, neurotóxica, cardiotoxica, agregadora de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória, reforçando a importância destas enzimas nos envenenamentos botrópicos (KINI & EVANS, 1989). A necrose muscular é uma séria consequência dos envenenamentos botrópicos que pode levar a perda de tecido, frequentemente culminando com a amputação do membro afetado. A mionecrose pode ser atribuída a uma ação direta de FLA₂s sobre a membrana plasmática de células musculares (GUTIÉRRES & LOMONTE, 1997; GUTIÉRRES, 2002; SOARES *et al.*, 2004a). Dessa forma, estudos voltados para a avaliação dos efeitos próinflamatórios destas enzimas revestem-se de importância. Como demonstrado por ZULIANI *et al.* (2005a), duas miotoxinas com

estrutura de FLA₂, a MT-II (Lys-49) e a MT-III (Asp-49), isoladas a partir do veneno da serpente *Bothrops asper*, induziram a liberação de eicosanóides (leucotrieno B₄ e tromboxana A₂) e citocinas (fator de necrose tumoral alfa, interleucina-1 e interleucina-6) no foco inflamatório induzido em modelos experimentais *in vivo*. Outro estudo verificou que a MT-II, em baixas concentrações, induz proliferação e, em altas concentrações, causa apoptose em linhagem de células B linfoblásticas (MORA *et al.*, 2005). Esta mesma miotoxina também foi capaz de ativar a fagocitose efetuada via receptores de complemento e de Fc de IgG (ZULIANI *et al.*, 2005b). Ainda, estas fosfolipases induziram edema e infiltrado leucocitário, além de apresentarem efeitos miotóxicos de modo independente da atividade catalítica (CHAVES *et al.*, 1998; GUTIERREZ *et al.*, 1986; LOMONTE & GUTIERREZ, 1989; LOMONTE *et al.*, 1993). Em relação ao veneno da serpente *Bothrops atrox*, LOMONTE *et al.* (1990), isolaram uma miotoxina básica (13.5 Kd) com atividade fosfolipásica e anticoagulante. KANASHIRO *et al.* (2002), demonstraram que duas fosfolipases A₂, denominadas BaFLA₂I (Lys-49) e Ba FLA₂III (Asp-49), também isoladas da serpente *B. atrox*, apresentaram forte atividade mionecrótica e edematogênica, induzindo ainda, a desgranulação de mastócitos e a liberação de creatina-quinase (CK). De acordo com este estudo, a atividade catalítica não parece contribuir para estes efeitos. Ainda, duas toxinas com estrutura de FLA₂ isoladas do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, Botropstoxina-I (Asp-49) e Botropstoxina-II (Lys-49), e uma terceira fosfolipase isolada a partir de *Bothrops pirajai*, denominada Piratoxina-I (Lys-49), induziram aumento da permeabilidade vascular e da desgranulação de mastócitos em ratos e promoveram a migração de neutrófilos humanos *in vitro*, levando à liberação de mediadores quimioatraentes como o LTB₄ e o PAF (MANCUSO *et al.*, 1995; LANDUCCI *et al.*, 1998; 2000; CASTRO *et al.*, 2000; GAMBERO *et al.*, 2001). Em outros estudos realizados, as Botropstoxina-I e -II demonstraram também efeitos miotóxicos e anticoagulantes (ANDRIÃO-ESCARSO, *et al.*, 2000), sendo que a Botropstoxina-II exibiu ainda atividade agregadora de plaquetas (FULY *et al.*, 2004). Além disso, duas FLA₂s miotóxicas isoladas de *Bothrops moojeni* (MjTX-I e -II, ambas Lys-49), têm sido bem caracterizadas, sendo que a MjTX-II foi capaz de induzir edema e mionecrose em camundongos (SOARES *et al.*, 2000a; 2004a; STÁBELI *et al.*, 2006). Adicionalmente, a partir do veneno da serpente *Lachesis muta muta*, da Amazônia, foi isolada uma FLA₂

ácida, com atividade enzimática, a LM-PLA₂-I, que demonstrou ser miotóxica e hemolítica, além de inibir a agregação plaquetária (FULY *et al.*, 2000) e modular a atividade de linfócitos *natural killer* (FULY *et al.*, 2007).

A maioria das FLA₂ isoladas a partir de venenos botrópicos são proteínas básicas com ponto isoelétrico variando entre 7-10. As FLA₂ ácidas ainda estão sendo estudadas e dados da literatura mostram que estas enzimas podem induzir efeitos farmacológicos como agregação plaquetária e hipotensão arterial (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; DE ALBUQUERQUE MODESTO *et al.*, 2006). As fosfolipases ácidas, em geral, não são miotóxicas, entretanto, quando este efeito aparece, pode ser baixo, se comparado às fosfolipases básicas, extremamente miotóxicas. Por outro lado, as fosfolipases ácidas possuem maior atividade catalítica (ROSEMBERG, 1983). Estudos complementares com estas enzimas devem ser realizados para que se possa ampliar o conhecimento de seus mecanismos enzimáticos, favorecendo assim, uma possível correlação entre os efeitos tóxicos e o potencial farmacológico destas enzimas.

Como demonstrado pela literatura, as FLA₂s desempenham papéis importantes em processos fisiológicos e fisiopatológicos, além de participarem da reação inflamatória local induzida por envenenamentos ofídicos, sendo de grande interesse médico-científico.

Apesar de estas enzimas estarem sendo amplamente estudadas, ainda se faz necessário investigar de maneira mais detalhada os mecanismos de ação das FLA₂s de venenos, o que poderá favorecer o melhor entendimento dos efeitos fisiopatológicos dos envenenamentos, além de contribuir para o uso destas enzimas como ferramentas biotecnológicas.

1.2- Resposta inflamatória aguda: considerações gerais

A inflamação pode ser definida como a resposta do tecido conjuntivo vascularizado a um estímulo nocivo, como infecção ou injúria tecidual, cujo o objetivo principal é remover o agente etiológico lesivo e reparar o tecido afetado (MAJNO & JORIS, 2004).

As alterações decorrentes se traduzem nos sinais clássicos da inflamação, descritos como rubor, tumor, calor e dor. Tais sinais são de natureza sensivelmente padronizada, e expressam fenômenos estruturais e funcionais que ocorrem na microcirculação e no tecido intersticial adjacente, com a participação da inervação sensitiva local (GARCIA LEME, 1989; BUCKLEY & BRAIN, 1994). Esses fenômenos envolvem a liberação coordenada de componentes do sangue (plasma e leucócitos) para o sítio da injúria, desencadeando a produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, tais como quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanóides e produtos da cascata proteolítica. Estes mediadores promovem a formação de um exsudato inflamatório local: proteínas plasmáticas e leucócitos que antes estavam restritos aos vasos sanguíneos, agora conseguem acessar o sítio da inflamação através das vênulas pós-capilares (POBER & SESSA, 2007; KULINSKY, 2007). Esta resposta vasomotora é desencadeada pela liberação de aminas vasoativas, e leva à formação de edema, devido ao fluxo de plasma e proteínas para o compartimento intravascular dentro do interstício, como resultado da ação de histaminas, bradicininas, substância P, fator ativador de plaquetas (PAF), leucotrieno e componentes do complemento. A função fundamental desta mudança na permeabilidade vascular é facilitar a liberação de mediadores inflamatórios e a migração de leucócitos para o sítio da inflamação (SHERWOOD *et al.*, 2004; MONACO & LAWRENCE, 2003).

A interação dos leucócitos circulantes com o endotélio vascular é o primeiro passo para o recrutamento destas células para o local da injúria (SHERWOOD *et al.*, 2004; MONACO & LAWRENCE, 2003). A ativação das células endoteliais promove um extravasamento seletivo de leucócitos, impedindo a saída de eritrócitos dos vasos sanguíneos. Esta seletividade decorre da interação entre selectinas presentes na superfície das células endoteliais com integrinas e receptores de quimiocinas localizados na superfície dos leucócitos, proporcionando um movimento de rolamento e adesão firme destas células (POLIOUT *et al.*, 1998; POBER & SESSA, 2007). Estes eventos levam à migração de leucócitos, primeiramente neutrófilos e, em seguida, monócitos, através dos espaços intercelulares, entre as células endoteliais, em direção ao gradiente de mediadores quimiotáticos, presente no tecido lesado (HUBBARD & ROTHLEIN, 2000). Os monócitos, ao chegarem ao foco da inflamação, diferenciam-se em macrófagos. Estes promovem a eliminação de eventuais microorganismos ou outros agentes injuriosos através

do processo de fagocitose e da geração de substâncias microbidas, um fenômeno central do processo de inflamação.

1.3- Papel do macrófago na reação inflamatória

O macrófago é o principal componente celular do sistema monocítico fagocitário. Esta célula é formada a partir das células tronco hematopoiéticas na medula óssea e entra na circulação como monócito. Em condições normais, uma pequena quantidade de monócitos é recrutada para os tecidos, originando populações de macrófagos residentes. Após a ocorrência de qualquer injúria, como infecção ou inflamação, há maior produção e recrutamento destas células, levando à um aumento do número de monócitos que chegam ao tecido lesado. Este evento é mediado pela produção de citocinas no local da lesão (GORDON *et al.*, 1992). No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação, por meio de seus receptores, que o capacita a desenvolver quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e atividade anti-tumoral. Por ser um fagócito profissional, assim como o neutrófilo, o macrófago possui um papel importante na resposta imune inata contra patógenos invasores, na resolução da inflamação e na manutenção da homeostasia dos tecidos, através da captação de células senescentes (WITKO-SARSAT *et al.*, 2000; ADEREM & UNDERHILL, 1999).

O principal mecanismo efetor do macrófago, a fagocitose, consiste em um evento extremamente complexo devido à diversidade de receptores capazes de desencadeá-lo. O pesquisador russo ELIE METCHNIKOFF foi o primeiro a descrever o processo, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1908 (KERRIGAN & BROWN, 2009). Neste processo, dependente de actina, os fagócitos ingerem partículas grandes, geralmente maiores que 0,5 μm (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

A fagocitose inicia-se com o esparaiamento da célula e redistribuição das organelas citoplasmáticas, com aumento da área de contato da membrana celular com o substrato a ser fagocitado (RABINOVITCH, 1975). Na superfície dos fagócitos há uma grande variedade de receptores hábeis em reconhecer e interagir com seus ligantes cognatos expressos na superfície de agentes infecciosos e de células apoptóticas (STUART &

EZEKOWITZ, 2005). Essa interação leva à polimerização dos filamentos de actina no sítio onde ocorrerá a ingestão, desencadeando o englobamento da partícula (ADEREM & UNDERHILL, 1999).

Em macrófagos, há diversos receptores já identificados. Dentre eles, podemos citar os receptores para os produtos de clivagem do sistema complemento (CR1, CR2 e CR3), para a porção Fc da imunoglobulina G (FcγR), para os resíduos de manose e fucose (MR) e receptores para β-glucano (Dectin-1), componente presente na parede celular de fungos (ADEREM & UNDERHILL, 1999; GANTNER *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 2005). Há ainda receptores que reconhecem estruturas microbianas bem conservadas como o lipopolissacarídeo (LPS) dentre outros componentes conhecidos como PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno). Estes receptores são denominados receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Os receptores FcγR e CR3 são especializados no reconhecimento e captação de partículas opsonizadas por IgG e por proteínas do complemento C3b/C3bi, respectivamente. Quando o anticorpo e o sistema complemento opsonizam o patógeno, a fagocitose é grandemente favorecida.

Dependendo do receptor acionado, o processo de englobamento de partículas pode ser diferenciado, levando a mecanismos distintos de reorganização do citoesqueleto de actina. A ativação dos receptores FcγR leva à formação de ondulações na membrana e extensão de pseudópodes de modo semelhante a um zíper enquanto a ativação de receptores para o sistema complemento faz com que a partícula seja internalizada por endocitose, com pouca ou nenhuma protrusão na membrana (ALLEN & ADEREM, 1996; CARON & HALL, 1998). A ligação das partículas ao receptor Fcγ ocorre por uma via de sinalização mediada pelo imunoreceptor com motivos de ativação baseado em tirosina, os ITAMs (SANCHEZ-MEJORADA & ROSALES, 1998). Os ITAMs recrutam kinases da família Syk e Src, levando a uma subsequente ativação de PI3 Kinase e Rho da família GTPases (principalmente Rac 1 e Cdc 42) conduzindo à polimerização da actina e extensão da membrana (VIDARSSON & VAN DE WINKEL, 1998; COX *et al.*, 1999). Em comparação, o receptor 3 do complemento (CR3 também conhecido como integrina CD11b/CD18 ou Mac-1) necessita de um sinal de ativação adicional para uma eficiente ligação da partícula e consequente fagocitose. A ativação desses sinais pode ser desencadeada por uma grande variedade de estímulos, como, ésteres de phorbol,

lipopolissacarídeo (LPS), citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas. Ainda, os receptores para porção Fc da imunoglobulina G e para os resíduos manose/fucose levam à liberação de mediadores proinflamatórios como citocinas, intermediários reativos do oxigênio e metabólitos do ácido araquidônico (LENNARTZ *et al.*, 1993; CARON & HALL, 1998).

Após serem internalizadas durante o processo de fagocitose, as partículas são liberadas em uma vesícula altamente especializada, o fagossoma (REEVES *et al.*, 2002). O fagossoma passa por diversas etapas de maturação, culminando com sua fusão aos grânulos lisossomais, originando o fagolisossomo. Consequentemente, as enzimas presentes nestes grânulos são liberadas, proporcionando um ambiente altamente hidrolítico que auxilia na eliminação do agente lesivo. Essas enzimas na presença do íon cloro (Cl^-), convertem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produto do metabolismo celular, a ácido hipocloroso (HOCl), considerado um potente agente microbicida (KING *et al.*, 1997; REEVES *et al.*, 2002).

Subsequentemente, o macrófago induz um abrupto aumento no metabolismo oxidativo denominado “burst” respiratório, mediado pela NADPH oxidase. O complexo NADPH-oxidase possui estrutura relativamente complexa, sendo composta por seis unidades multiméricas, dentre as quais, $\text{gp91}^{\text{phox}}$ e p22^{phox} , proteínas integrais de membrana que, juntas, formam o citocromo b558. Além disso, as proteínas p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} e Rac 2 estão no citosol durante o estado de repouso e em resposta a estímulos como partículas opsonizadas, lipídios bioativos, peptídeos quimiotáticos ou anticorpos, essas subunidades migram do citosol para a membrana plasmática e se associam ao citocromo b558. Depois do complexo montado, ocorre a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de O_2^- (GROEMPING & RITTINGER, 2005; LAMBETH, 2007; SUMIMOTO, 2005; BABIOR, 1999).

Durante a fagocitose, a subunidade p47^{phox} é fosforilada, sendo esse um evento indispensável à ativação do “burst” respiratório. A atividade do complexo NADPH-oxidase está restrita ao ambiente fagossômico como forma de prevenção da destruição do tecido do hospedeiro pelas espécies reativas do oxigênio (EROs) geradas. O ânion superóxido é um reagente óxido-redutor, extremamente potente, capaz de sofrer oxidação para O_2 ou redução para H_2O_2 , que também atua como microbicida (BABIOR, 1973).

Esses derivados reativos do oxigênio são mediadores inflamatórios e desempenham um importante papel na defesa do hospedeiro, sendo essenciais para a destruição de patógenos invasores. Apesar disso, há indícios de que a produção de outro agente microbicida, o óxido nítrico, seja o mecanismo mais acentuado em macrófagos.

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel em água e em lipídios, sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas chamadas óxido nítrico sintases (NOS). Três isoformas de NOS são conhecidas atualmente. Nas células endoteliais, a isoforma mais encontrada é a NOS constitutiva (cNOS) que é dependente de cálcio. No tecido nervoso, a isoforma mais abundante é a bNOS (nNOS), também dependente de cálcio. A forma induzida da NOS (iNOS) é encontrada em vários tipos celulares e não é normalmente expressa nas células, mas induzida por citocinas como o TNF- α , a IL-1 e INF- γ . Esta isoforma é independente de cálcio (FORSTERMANN *et al.*, 1995; ROBBINS & GRISHAM, 1997). O NO se difunde rapidamente através de membranas celulares e atua como mediador de várias funções fisiológicas como neurotransmissão e vasodilatação (PALMER *et al.*, 1987; DOWNEN *et al.*, 1999), além de apresentar atividade tumoricida e/ou microbicida (HIBBS *et al.*, 1989). Ainda, o óxido nítrico pode interagir com o ânion superóxido (O_2^-) e formar um potente agente oxidante, o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), mais tóxico que os seus precursores (ISCHIROPOULOS *et al.*, 1996; ROHN *et al.*, 1999).

Além de produzir uma grande variedade de agentes microbicidas, os macrófagos também são responsáveis pela liberação de citocinas com inúmeras atividades biológicas, que incluem a indução e a modulação de diversos processos inflamatórios e metabólicos.

A principal citocina sintetizada pelos macrófagos é o TNF- α , um mediador da resposta inflamatória que estimula a proliferação de fibroblastos, aumenta a aderência de neutrófilos à matriz celular, induz a produção de citocinas como IL-1 e IL-6 e ativa funções leucocitárias (THOMMESEN *et al.*, 1998). Além disso, o TNF- α está envolvido na patogênese do choque séptico induzido por bactérias Gram-negativas, o que torna esta citocina extremamente importante em processos inflamatórios (DINARELLO, 1991).

Após esta fase aguda, podem ocorrer os fenômenos de reparo, com a permanência de macrófagos até a resolução do processo inflamatório. A reação inflamatória, portanto, é parte de um processo fisiológico voltado para conter o dano e restabelecer a homeostasia

do tecido. Entretanto, quando este processo não é controlado e a inflamação persiste, a função de reparo é perdida, podendo causar novos danos ao tecido (NATHAN, 2002).

Como podemos observar, o macrófago tem uma função vital na resposta imunológica do hospedeiro contra patógenos e são os maiores produtores de estímulos proinflamatórios, principalmente eicosanóides.

Eicosanóide é um termo usado para descrever as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos, derivados de ácidos graxos essenciais que possuem cadeias com 20 átomos de carbono. Estes compostos possuem uma variedade de atividades biológicas consideradas importantes nas reações inflamatórias.

O início da síntese de eicosanóides ocorre quando as células são estimuladas a liberar ácido araquidônico (AA) em decorrência de algum tipo de estresse, seja um estímulo exógeno ou a ação de produtos da resposta imunológica do hospedeiro (citocinas). Estes estímulos levam à ativação de enzimas dependentes de cálcio, como as FLA₂s, que hidrolisam os fosfolipídios de membrana, promovendo a liberação do AA. O AA liberado é metabolizado rapidamente por vários complexos enzimáticos, que incluem as ciclooxigenases, as lipoxigenases e o citocromo P450 (SARAU *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2000).

A metabolização do AA pelo complexo enzimático das ciclooxigenases acarreta a formação dos prostanóides, que incluem prostaglandinas e tromboxanas (figura 2). São descritas, atualmente, três isoformas de ciclooxigenases, conhecidas como ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), e ciclooxigenase-3 (COX-3).

A COX-1 é a isoforma expressa, de forma constitutiva, na maioria das células e tecidos, como monócitos e endotélio, sendo responsável pela síntese de prostanóides em condições fisiológicas, auxiliando na homeostasia de tecidos e na manutenção da integridade da mucosa gástrica (BOTTING *et al.*, 2006; DUBOIS *et al.*, 1998).

A COX-2, por sua vez, pode ser constitutiva ou induzida em vários tipos celulares. A expressão constitutiva desta isoforma ocorre em algumas áreas do sistema nervoso central e do sistema gástrico (CAO *et al.*, 1995; KARGMAN, *et al.*, 1996). A indução de sua expressão se dá por fatores intimamente relacionados à inflamação, dentre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon alfa (INF- α), IL-1 e fator de crescimento beta (TGF- β) (DIAZ, *et al.*, 1998; APPLETON *et al.*, 1996). Estas citocinas são liberadas por

células envolvidas em processos inflamatórios, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais.

A enzima COX-3 foi descrita em 2004 (WARNWER & MITCHELL, 2004). Esta ciclooxygenase é sintetizada a partir de uma junção alternativa da sequência gênica correspondente à COX-1. Devido a isso, muitos autores consideram que a denominação mais apropriada para a isoforma COX-3 seria COX-1b (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002). A COX-3 possui baixa atividade para a síntese de prostaglandinas, sendo ainda pouco estudada.

As prostaglandinas e tromboxanas estão envolvidas em diversos eventos inflamatórios. A prostaglandina da série E₂ (PGE₂) é a mais abundante do organismo. Este eicosanóide é secretado em grandes quantidades pelos macrófagos, atuando como um regulador autócrino da atividade destas células (DUBOIS *et al.*, 1998). Além disso, possui atividades anti- e proinflamatórias. A ação antiinflamatória está relacionada com a inibição da produção de citocinas por monócitos e por células TH1 (ROPER & PHIPPS, 1992), e da fagocitose por macrófagos (DAVIDSON *et al.*, 1998). Já os efeitos pró-inflamatórios incluem vasodilatação, hiperalgesia e aumento da permeabilidade vascular induzida pela histamina e pela bradicinina (CIRINO, 1998; PORTANOVA *et al.*, 1996).

O tromboxano do tipo A₂ (TXA₂) é um composto instável e possui meia-vida de 30 segundos. Sua ação é proinflamatória, caracterizada pela indução do aumento da expressão de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas, aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia de leucócitos, além da facilitação da produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β (CAUGHEY *et al.*, 1997; ISHIZUKA *et al.*, 1996). Ainda, este eicosanóide atua na modulação da hemodinâmica, em funções cardiovasculares e tem potente atividade agregadora de plaquetas (HIRATA *et al.*, 1996).

Outra via de metabolização do AA envolve a ação de enzimas citoplasmáticas denominadas 5, 12 ou 15-lipoxigenases. A via da 5-lipoxigenase (5-LO) é a mais estudada e tem como produto os leucotrienos (figura 2). O passo inicial é a conversão do AA em leucotrieno A₄. A hidrólise enzimática do leucotrieno A₄ leva à formação do leucotrieno B₄ (LTB₄), um potente mediador inflamatório com ação quimiotática para diversos tipos de leucócitos (neutrófilos, células dendríticas, linfócitos T) (FORD-HUTCHINSON, 1990; PETERS-GOLDEN & HENDERSON, 2007). O LTB₄ também promove o movimento de

leucócitos, facilitando sua aderência ao endotélio por induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão da família das $\beta 2$ -integrinas (STEADMAN *et al*, 1996). Ainda, induz o aumento da produção de ânion superóxido e a liberação de enzimas lisossomais (FORD-HUTCHINSON, 1990). Os leucotrienos são mediadores importantes em doenças como a asma e a rinite alérgica, além de contribuírem para a fisiopatologia da aterosclerose. Além disso, os produtos da via da 5-LO podem favorecer o desenvolvimento e a progressão de doenças como o câncer (RADMARK & SAMUELSON, 2010).

Outros produtos do metabolismo do AA incluem ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs), lipoxinas, ácidos epoxieicosatrienicos e isoprostanos, que podem também contribuir para a modulação das respostas inflamatórias (figura 2) (SERHAN & OLIW, 2001).

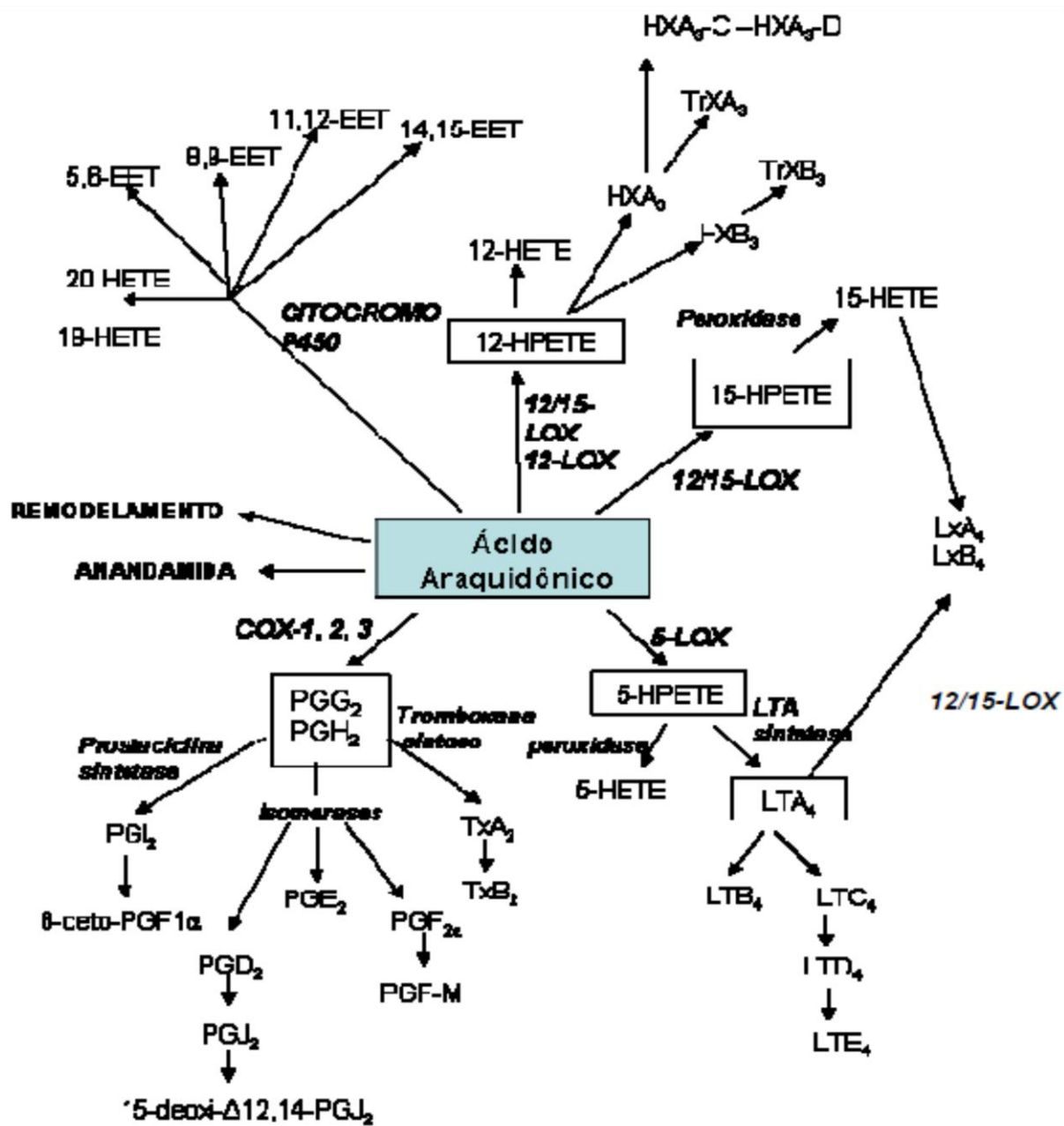


Figura 2: Quadro esquemático dos mediadores produzidos a partir do ácido araquidônico (BOGATCHEVA *et al.*, 2005 - Araquidonic acid cascade in endothelial pathobiology, p.107-127).

Como demonstrado, os eicosanóides são importantes mediadores do processo inflamatório produzidos por leucócitos, principalmente macrófagos. Estudos demonstraram que estruturas esféricas de tamanho variável presentes no citoplasma dos leucócitos, denominadas corpúsculos lipídicos, podem estar associadas à produção destes mediadores. Estas estruturas são organelas dinâmicas envolvidas no armazenamento de lipídios em diferentes células e organismos (BOZZA, *et al.*, 2007). Além de desempenhar papéis importantes na homeostasia de lipídios, estas estruturas têm sido apontadas, por recentes estudos, como organelas multifuncionais, atuando na sinalização, transporte e ativação celular (MARTIN & PARTON, 2006; BOZZA, *et al.*, 2007).

Os corpúsculos lipídicos aparecem com frequência em macrófagos, granulócitos e mastócitos, tendo seu número e tamanho aumentados na vigência de processos inflamatórios, imunológicos e neoplásicos. Vias de sinalização envolvendo o fator ativador de plaquetas (PAF), também levam ao aumento de corpúsculos lipídicos. Apesar de sua formação ser induzida rapidamente durante a inflamação, os mecanismos envolvidos tanto na sua formação quanto em sua função ainda não estão claros. Tem sido proposto que os corpúsculos lipídicos são originados do retículo endoplasmático ou são uma sub-região desta organela (MURPHY *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos indicam que a formação dos corpúsculos lipídicos parece estar associada à ativação de determinadas vias de sinalização que incluem a PKC e a FLC (WELLER *et al.*, 1991a).

Os corpúsculos lipídicos encontrados no citoplasma de mastócitos e macrófagos representam o maior sítio para armazenamento e metabolização de produtos do AA. A formação e a compartimentação de enzimas dentro destas organelas são altamente reguladas por mecanismos celulares diretamente relacionados com a capacidade dos leucócitos de gerarem eicosanóides. Acredita-se que os corpúsculos lipídicos estejam envolvidos na formação destes mediadores por conterem, em seu interior, os sistemas COX, 5-LO e leucotrieno C₄ sintase, além de ácido araquidônico e cFLA₂, MAPK e PI3K (BOZZA *et al.*, 1996; 1997).

A importância dos corpúsculos lipídicos para o processo inflamatório tem sido demonstrada. De acordo com BOZZA *et al.* (2007), estudos realizados com MCP-1, um protótipo de quimiocina da subfamília β , levaram à biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos, através de um mecanismo altamente regulado, dependente de microtúbulos,

que acarretou o aumento da síntese de LTB_4 durante a inflamação. O mesmo mecanismo tem sido observado em sepsis e endotoxemia, visto que a presença de COX-2 e 5-LO, foi verificada no interior dos corpúsculos lipídicos de macrófagos e neutrófilos de pacientes com choque séptico e de camundongos injetados com LPS. Ainda, patógenos incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, são capazes de ativar receptores específicos, sinalizando a ativação da maquinaria de montagem de corpúsculos lipídicos (PACHECO *et al.*, 2002; D'AVILA, *et al.*, 2007). Outros estudos realizados por VAN MANEN *et al.* (2005) mostraram que os corpúsculos lipídicos estão associados ao fagossoma e que esta associação é dependente de $gp91^{phox}$, a subunidade catalítica da NADPH oxidase. Há ainda, evidências de que estas organelas podem se associar à estruturas como autofagossoma e proteassoma, sugerindo sua participação em processos celulares relacionados à apresentação de antígenos (FUJIMOTO *et al.*, 2008). Baseando-se nisso, BOUGNÉRES *et al.* (2009) demonstraram, com ensaios de imunofluorescência, a participação dos corpúsculos lipídicos no processo de apresentação de antígenos em células dendríticas (DCs). Foi observado que as DCs que continham grandes quantidades de corpúsculos lipídicos em seu interior eram mais eficientes na apresentação de antígenos em comparação àquelas que possuíam pouca quantidade destas organelas. O estudo demonstrou, ainda, que este processo é dependente de uma GTPase da família P47, a *Irgm3*, sendo fortemente estimulado por interferon-gama ($INF-\gamma$). Adicionalmente, estudos comprovaram o papel destas organelas em processos inflamatórios demonstrando que no interior das mesmas podem ser encontradas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em leucócitos ativados. O $TNF-\alpha$ foi detectado em corpúsculos lipídicos citoplasmáticos de fibroblastos, eosinófilos, macrófagos e mastócitos em biópsias de doença de Crohn (BEILS *et al.*, 1995) e também em neutrófilos e monócitos de pacientes com sepse ou ainda em leucócitos após a estimulação com LPS (PACHECO *et al.*, 2002). Citocinas como IL-16 e RANTES também foram encontradas nos corpúsculos lipídicos de eosinófilos humanos (LIM *et al.*, 1996).

Assim, os corpúsculos lipídicos têm um papel central na inflamação, sendo considerados marcadores de células inflamatórias em uma variedade de doenças. Essas organelas contribuem para a gênese de respostas imunes e inflamatórias, representando, assim, um importante alvo terapêutico para o controle de distúrbios inflamatórios.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

Este estudo teve por objetivo geral, avaliar o efeito *in vitro* de três fosfolipases A₂, a BaTX-I básica - contendo aspartato na posição 49, a BaTX-II básica – contendo lisina posição 49, e a BaFLA₂ ácida – também contendo aspartato na posição 49, isoladas do veneno da serpente *Bothrops atrox*, sobre a viabilidade e funcionalidade de macrófagos J774A.1 em cultura.

2.2 Específicos

A partir de ensaios *in vitro* foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Viabilidade celular;
- Capacidade de adesão;
- Capacidade de descolamento;
- Taxa de fagocitose;
- Produção de ânion superóxido;
- Volume lisossomal;
- Formação de corpúsculos lipídicos na presença e na ausência de partículas de zimosan opsonizado;
- Produção de TNF- α .

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Macrófagos J774A.1

Os macrófagos murinos da linhagem J774A.1, gentilmente cedidos pelo Dr. Fábio Kwasniewski, foram cultivados em garrafas de polietileno preenchidas com meio de cultura RPMI-1640, suplementado com estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM) e 10% de soro fetal bovino. A cultura foi mantida em estufa a 37° C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂. Após formarem uma monocamada na superfície da garrafa plástica, as células foram lavadas com meio RPMI não suplementado e destacadas da garrafa com auxílio de um cell scrap. Em seguida, as células foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI suplementado para então serem utilizadas nos ensaios.

3.2- Fosfolipases A₂

As enzimas utilizadas neste estudo, a FLA₂-Asp-49 básica (BaTX-I), a FLA₂-Lys-49 básica (BaTX-II) e a FLA₂-Asp-49 ácida (BaFLA₂), isoladas do veneno da serpente *B. atrox*, foram fornecidas pelo Dr. Andreimar M. Soares, da Faculdade de Ciências Farmacológicas e Bromatológicas da Universidade de São Paulo. As toxinas foram purificadas em coluna *CM-Sepharose* e posteriormente, em coluna *phenyl-Sepharose* CL4B de acordo com a metodologia proposta por Andrião-Escarso *et al.*, (2000). A homogeneidade foi demonstrada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições redutoras (LAEMMLI, 1970). Até o momento de sua utilização, as fosfolipases A₂ foram mantidas a -20° C.

3.3- Teste de viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripán

Os macrófagos murinos da linhagem J774A.1, foram suspensos em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com gentamicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino, de modo a obter-se 2x10⁵ células/mL. A seguir, as células foram incubadas, em duplicata, com BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ nas concentrações de 1.5, 3 e 6µg/mL ou RPMI (controle), por 1 hora, a 37° C, em atmosfera a 5% de CO₂. Para

avaliar a viabilidade, 20µL de solução de azul de Trypan (0,1%) foi adicionado a 100µL de suspensão de macrófagos. O índice de viabilidade foi determinado por contagem de células viáveis em hemocitômetro de Neubauer, ao microscópio de luz, num total de 100 células. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células.

3.4- Determinação da capacidade de adesão

Para este ensaio, os macrófagos tiveram sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/50\mu\text{L}$. Em placas de 96 poços, os macrófagos foram adicionados e incubados em duplicata com RPMI (controle) ou uma solução de 50µL de BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de 6µg/mL, a 37° C e 5% de CO₂, durante 60 minutos. Após esse período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 100µL de metanol 100%, por 10 minutos. Após serem novamente lavadas com PBS, as células foram coradas com uma solução de Giemsa 0,1%, por 40 minutos. Em seguida, uma nova lavagem dos poços foi realizada e um volume de 100µL de metanol 100% foi adicionado para solubilizar o corante. A absorbância foi determinada por espectrofotometria a 550 nm. O grupo controle foi considerado 100%. Os resultados foram expressos em absorbância de células aderidas em relação ao número total de células.

3.5- Determinação da capacidade de descolamento

Para este ensaio, a suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/50\mu\text{L}$. Após 24 horas aderindo em placas de 96 poços, os macrófagos foram incubados em duplicata com RPMI (controle) ou uma solução de 50µL de BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de 6µg/mL, a 37° C e 5% de O₂, durante 60 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas com 100µL de metanol 100%, por 10 minutos. Uma nova lavagem com PBS foi realizada e as células foram então, coradas com uma solução de Giemsa 0,1%, por 40 minutos. Após a lavagem dos poços, foi adicionado 100µL de metanol 100% para solubilizar o corante. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a 550 nm. O grupo controle foi considerado 100%. Os resultados foram expressos em absorbância de células aderidas em relação ao número total de células.

3.6- Determinação da fagocitose via receptor de complemento por macrófagos

Para a avaliação da capacidade fagocítica via receptor de complemento, partículas de zimosan opsonizado foram utilizadas. Para este ensaio, a suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/50\mu\text{L}$. Lamínulas de vidro foram colocadas em placas de 24 poços e, sobre essas lamínulas, adicionados os macrófagos, mantidos por 2 horas, a 37°C e 5% de CO_2 , para aderência. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas com RPMI sem soro fetal bovino (controle) ou $50\mu\text{L}$ de solução de BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de $6\mu\text{g/mL}$, a 37°C e 5% de CO_2 , durante 1 hora. Após nova lavagem em PBS adicionou-se 2×10^6 partículas de zimosan opsonizadas mantendo-se a proporção de 10 partículas de zimosan para cada célula, perfazendo um volume final de $500\mu\text{L}$. Após a incubação a 37°C e 5% de CO_2 por 40 minutos, as lamínulas foram lavadas em PBS e fixadas com $300\mu\text{L}$ de glutaraldeído tamponado (2,5%), por 15 minutos. Após nova lavagem com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio. Foi contado um total de 200 células, em microscópio óptico, sendo considerados positivos os macrófagos que englobaram 3 ou mais partículas de zimosan e negativos os que não englobaram partículas. Os resultados foram expressos em porcentagem de fagocitose em relação ao número total de células.

3.6.1- Obtenção do zimosan opsonizado com soro de camundongo normal

Uma suspensão contendo $5,7\text{mg/mL}$ de zimozan (obtido da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*) foi diluída 20 vezes em PBS, pH 7,2. O material foi incubado com soro obtido de camundongos *swiss* normal, na proporção de 1:1, a 37°C , sob agitação constante. Após 30 minutos, esse material foi centrifugado a 2000 rpm por 15 minutos e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de PBS, pH 7,2.

3.7- Determinação da produção do ânion superóxido em lâmina

Para este teste, a suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/200\mu\text{L}$ e as células foram incubadas por 1 hora com meio de cultura RPMI, 0,1% de azul de nitrotetrazólio (NBT), $10\mu\text{L}$ de acetato de forbol miristato (PMA), na concentração de 500ng/mL (controle positivo) e com BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração

de 6µg/mL, a 37° C. Em seguida, as amostras foram colocadas em citocentrífuga para preparo das lâminas. Após centrifugação a 1000 rpm/5 minutos, as lâminas foram fixadas com metanol 100% por 5 minutos e coradas com safranina 1% (diluída em ácido acético), também por 5 minutos. Ao final do processo, as lâminas foram lavadas com água destilada. A visualização foi feita com auxílio do microscópio em objetiva de 100x. Fez-se a contagem de 100 células, considerando-se positivas as células que apresentaram cristais de formazan, decorrentes da redução do “nitroblue tetrazolium” (NBT). Os resultados foram expressos em porcentagem de produção de ânion superóxido em relação ao número total de células.

3.8- Coloração e enumeração dos corpúsculos lipídicos

As lamínulas, contendo macrófagos aderidos, foram incubadas com RPMI (controle não estimulado) ou solução de RPMI contendo BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ (6µg/mL), durante 1 hora. A seguir, um grupo de lamínulas foi submetido ao processo de fagocitose de partículas de zimosan opsonizado, como descrito no item 3.6, porém com fixação das células em 1mL de formaldeído tamponado (3,7%), por 15 minutos, e sem montagem em lâminas. As lamínulas, assim fixadas, foram lavadas e adicionadas de 50µL de tampão cacodilato (0,1M)/lamínula, seguido de 50µL de tetróxido de ósmio a 1,5%, por 30 minutos. Após lavagem em água destilada, as lamínulas foram imersas em 1% de tiocarboxidrazida, por 5 minutos e novamente lavadas em tampão cacodilato. Posteriormente, as lamínulas foram coradas com tetróxido de ósmio, a 1,5%, por 3 minutos e lavadas em água destilada. A seguir, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscópio. Os corpúsculos lipídicos, formados no interior dos macrófagos, foram contados, em um total de 50 células por campo, em microscópio de contraste de fase. Os resultados foram expressos em porcentagem de corpúsculos lipídicos em relação ao número total de células.

3.9- Determinação do volume lisossomal

Este ensaio, que avalia as vesículas do compartimento endocítico, através da retenção do corante vermelho neutro pelos lisossomos, foi realizado de acordo com PIPE (1995). Para este fim, a suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para

2×10^5 /200 μ L e as células foram incubadas por 15, 30 e 60 minutos com meio de cultura RPMI (controle) e com BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de 6 μ g/mL, a 37° C. A seguir, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm e o sobrenadante foi descartado. As células foram, então, incubadas com RPMI e uma solução de vermelho neutro a 0,04% em um volume final de 200 μ L, por 30 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS por três vezes e um volume de 200 μ L de uma solução de extração (ácido acético glacial 1% e etanol 30% diluídos em água destilada) foi adicionado para a solubilização do vermelho neutro internalizado pelos lisossomos das células. Esta solubilização é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular e, uma vez presente no lisossomo, fica aprisionado devido à mudança de cargas causada pelo pH ácido do sistema lisossomal. Ao final, a absorbância foi determinada por espectrofotometria a 505 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento de volume lisossomal em relação ao número total de células.

3.10- Quantificação de TNF- α

Para este ensaio, os macrófagos J774A.1 tiveram sua concentração ajustada para 2×10^5 células, e foram incubados com RPMI (controle), ou INF- γ (1 μ g/mL - controle positivo), ou com as três toxinas, BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de 6 μ g/mL, por um período de 4 horas, a 37° C e 5% de CO₂. Ao final, o sobrenadante das amostras foi coletado para a determinação da produção de TNF- α por ensaio imunoenzimático. Neste ensaio utilizou-se uma placa de 96 poços revestida com anticorpo específico para TNF- α , onde foram adicionados 100 μ L das amostras. Posteriormente a placa foi incubada por um período de 2 horas, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes (Tampão PBS com Tween) e 100 μ L do anticorpo marcado foram adicionados. A placa, então, foi incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionou-se 100 μ L da solução de estreptavidina por 45 minutos, também em temperatura ambiente. Ao final desta etapa, a placa foi lavada mais uma vez e 100 μ L da solução substrato TMB foram adicionados por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Por fim, 50 μ L da solução STOP (H₂SO₄ 2N) foram adicionados e logo após a leitura foi determinada em 450 nm. A

concentração mínima detectável para TNF- α é geralmente inferior a 15 pg/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- α .

3.11- Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média + - erro padrão da média e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student ou Análise de variância (ANOVA), após teste de normalidade. Sendo considerados valores de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Efeito das três toxinas sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1.

A viabilidade dos macrófagos foi avaliada 1 hora após incubação com BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL. Como demonstra a Figura 3, as três FLA₂ secretórias nas concentrações estudadas, não afetaram a viabilidade dos macrófagos no período de 1 hora.

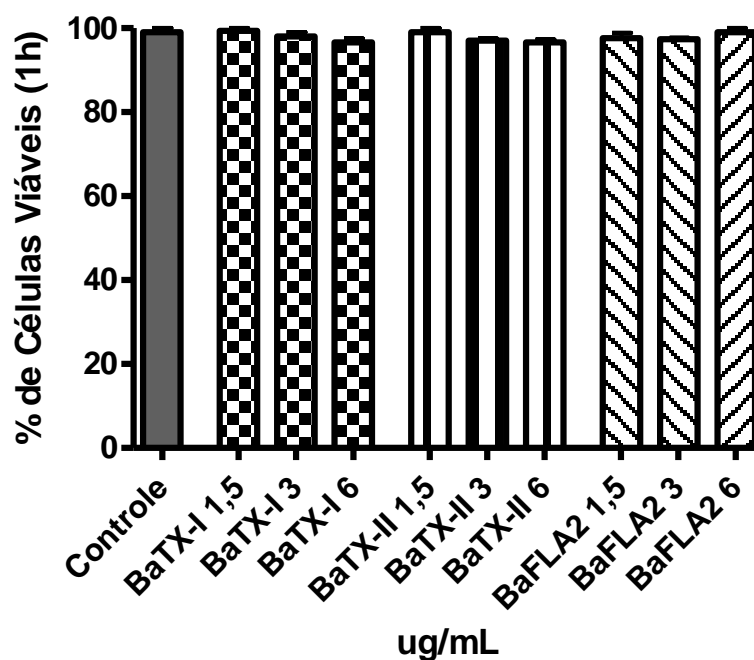


Fig. 3 - Efeito das FLA₂s BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774A.1. 2×10^5 células/mL foram incubadas por 1 hora com as FLA₂s nas concentrações descritas acima ou RPMI (controle). A viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados.

4.2- Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos J774A.1

Para avaliar o efeito das toxinas sobre a capacidade de adesão, os macrófagos foram incubados em placas de 96 poços por 1 hora, com RPMI (controle) ou BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ na concentração de 6 µg/mL.

A Figura 4 (A) demonstra que, nas concentrações estudadas, as três toxinas não interferiram na capacidade de adesão dos macrófagos.

E com o intuito de verificar se as toxinas eram capazes de afetar a capacidade de descolamento, os macrófagos foram incubados por 24 horas a 37° C e 5% de CO₂ na presença somente de RPMI suplementado. Logo após, uma lavagem com PBS foi realizada para que as células não aderidas fossem removidas. Em seguida, os macrófagos foram incubados por 1 hora, com RPMI (controle) ou BaTX-I ou BaTX-II ou BaFLA₂ (6 µg/mL).

A Figura 4 (B) mostra que as três toxinas não afetaram a capacidade de descolamento dos macrófagos J774A.1.

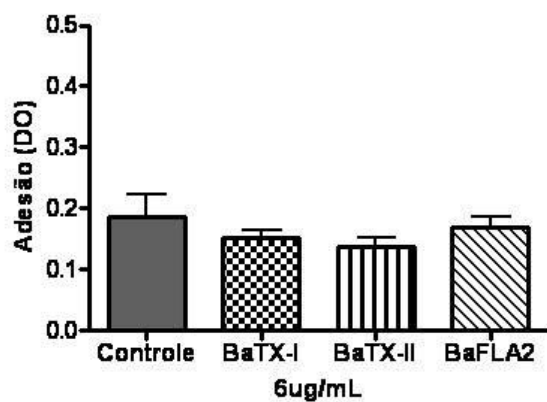
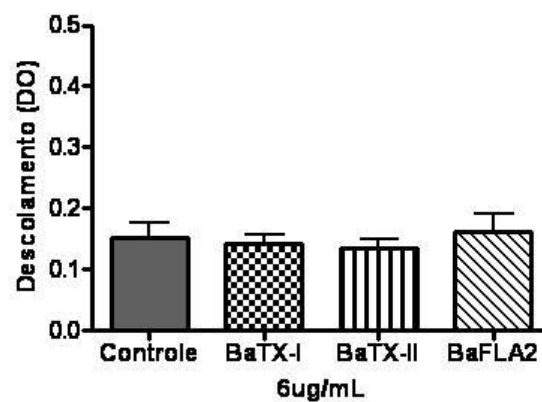
A- Adesão**B- Descolamento**

Fig 4 - Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos da linhagem J774A.1. 2×10^5 células/mL foram incubadas por 1 hora com as toxinas na concentração de 6 µg/ml ou RPMI (controle). Ao final do experimento, as leituras dos ensaios de adesão (A) e descolamento (B) foram determinadas por espectrofotometria em 550 nm. Os resultados foram expressos em absorbância. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados.

4.3- Efeito das três FLA₂s, BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂, sobre a fagocitose via receptor de complemento, em macrófagos J774A.1.

A fagocitose de partículas de zimosan opsonizado com soro normal de camundongo foi avaliada após a incubação dos macrófagos J774A.1 com RPMI (controle) ou com as toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ na concentração de 6µg/mL por um período de 1 hora. A figura 5 mostra que os macrófagos controles, apresentaram taxa de fagocitose de cerca de 37%. As toxinas BaTX-I e BaFLA₂, ambas Asp-49, apresentaram índice de fagocitose de 44,6% e 41,3%, respectivamente. Estes valores não foram considerados significantes em relação ao controle. Por outro lado, os macrófagos incubados com a toxina BaTX-II, uma Lys-49, apresentaram um aumento na sua capacidade fagocítica em relação ao controle.

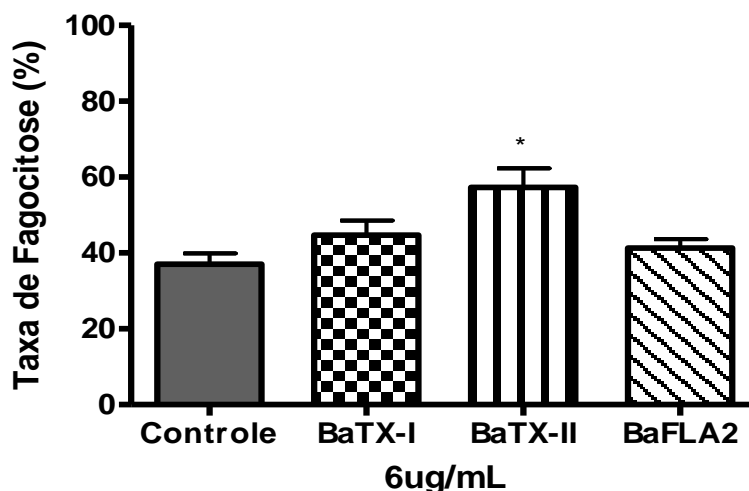


Fig 5 - Efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre capacidade fagocítica dos macrófagos da linhagem J774A.1. Os macrófagos (2×10^5 células/mL) foram incubados por 1 hora com as toxinas na concentração de 6µg/ml ou RPMI (controle). O índice fagocítico foi avaliado após contagem de 200 macrófagos, sendo considerados positivos aqueles que internalizaram três ou mais partículas de zimosan opsonizado. Os resultados foram expressos em porcentagem. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.4- Efeito das toxinas sobre a produção de superóxido por macrófagos J774A.1

A capacidade de produção de ânion superóxido pelos macrófagos foi determinada, em lâmina, pelo método de redução do NBT, um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel em sua forma reduzida, formando granulações azuladas no interior da célula. Neste ensaio, os macrófagos foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI (controle), com PMA (500 ng/mL, controle positivo), ou com 6µg/mL das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂. A figura 6 mostra que as células estimuladas com as fosfolipases, apresentaram um aumento significativo na produção de superóxido em relação ao controle não estimulado (RPMI). A figura mostra também, que não foi observada nenhuma diferença estatística entre a quantidade de superóxido produzido pelos macrófagos incubados com as toxinas e os macrófagos estimulados com o controle positivo (PMA).

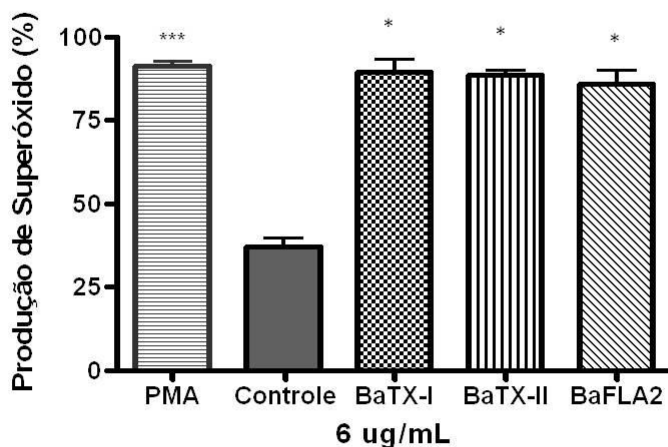


Fig 6 - Efeito das toxinas sobre a produção de superóxido *in vitro*. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$ e foram incubados por 1 hora com meio de cultura RPMI, 0,1% de NBT, 10µl de PMA (500ng/ml) (controle positivo) e com as toxinas na concentração de 6 µg/mL a 37° C. Foram contadas 100 células e consideradas positivas aquelas que apresentaram cristais de formazan em seu interior. Os dados foram expressos em % de ânion superóxido produzido pelas células e representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.5- Efeito das toxinas sobre o volume lisossomal dos macrófagos J774A.1

O efeito das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre o volume lisossomal dos macrófagos J774A.1 foi avaliado após a incubação das células com as fosfolipases na concentração de 6µg/mL por 15, 30 e 60 minutos. Como mostra a figura 7, após 15 minutos de incubação, apenas a BaTX-II induziu um aumento significativo do volume lisossomal dos macrófagos, em comparação ao controle (RPMI). Após 30 minutos de incubação, as três fosfolipases foram capazes de aumentar de forma significativa o volume lisossomal dos macrófagos. Após 60 minutos de incubação, o volume lisossomal das células estimuladas com as toxinas não apresentou diferença significativa em comparação ao volume lisossomal das células controle, incubadas apenas com RPMI.

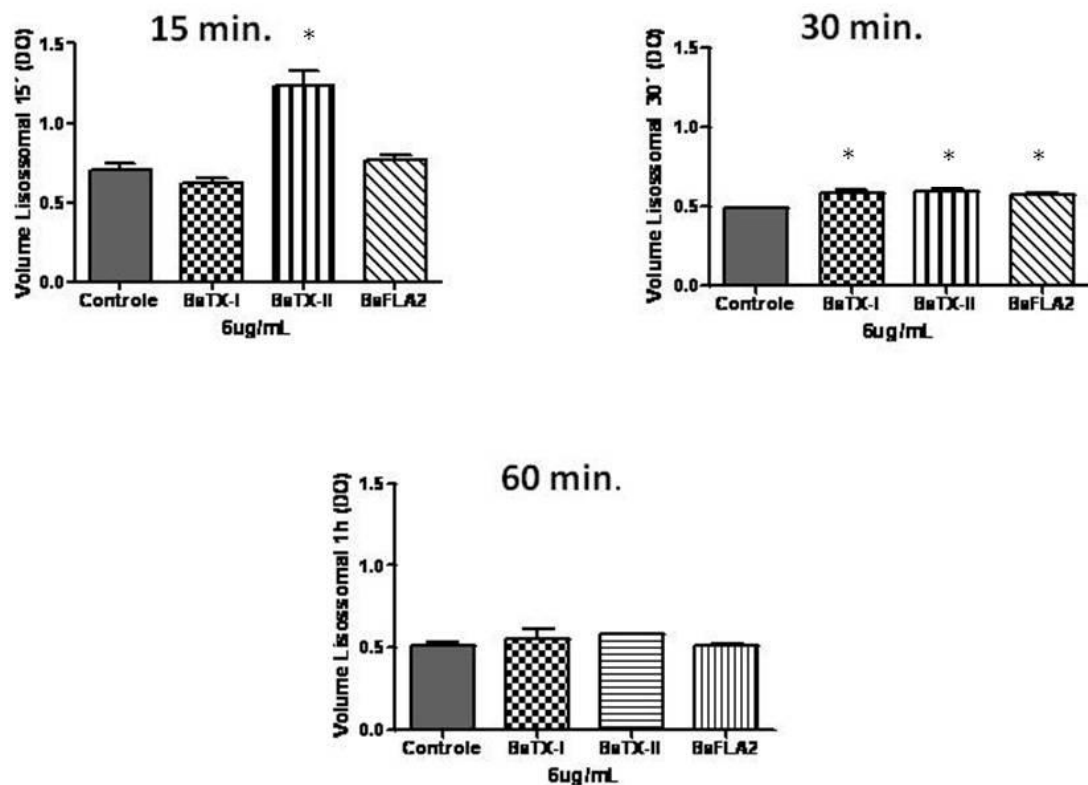


Fig 7 - Efeito das toxinas sobre o volume lisossomal dos macrófagos. A suspensão de macrófagos teve sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/200\mu\text{l}$. As células foram incubadas por 15, 30 e 60 minutos com meio de cultura RPMI e com as toxinas na concentração de $6\mu\text{g/mL}$ a 37°C . Em seguida, as células foram incubadas com 0,04% de vermelho neutro. Por fim, o corante internalizado foi solubilizado com a adição de $200\mu\text{l}$ uma solução de extração. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 505 nm em espectrofotômetro. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados. * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA).

4.6- Efeito das toxinas sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1

Para verificar se as fosfolipases BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ eram capazes de afetar a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1, as células foram incubadas por 1 hora com meio de cultura RPMI (controle) ou com as três toxinas na concentração de 6µg/mL. Como podemos observar na figura 8, o número de corpúsculos lipídicos encontrados nos macrófagos estimulados com as toxinas, foi significativamente maior se comparado aos macrófagos controle (RPMI). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre as três toxinas.

O efeito das sFLA₂ sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos após o processo de fagocitose também foi avaliado. A figura 8 mostra que os macrófagos estimulados com as fosfolipases e depois submetidos à fagocitose de partículas de zimosan opsonizado, apresentaram um número maior de corpúsculos lipídicos em seu interior, em comparação às células estimuladas com as toxinas, mas não submetidas ao processo de fagocitose. Como demonstrado, a BaTX-II, uma sFLA₂ Lys-49, foi a que induziu maior aumento no número de corpúsculos lipídicos nos macrófagos após o processo de fagocitose.

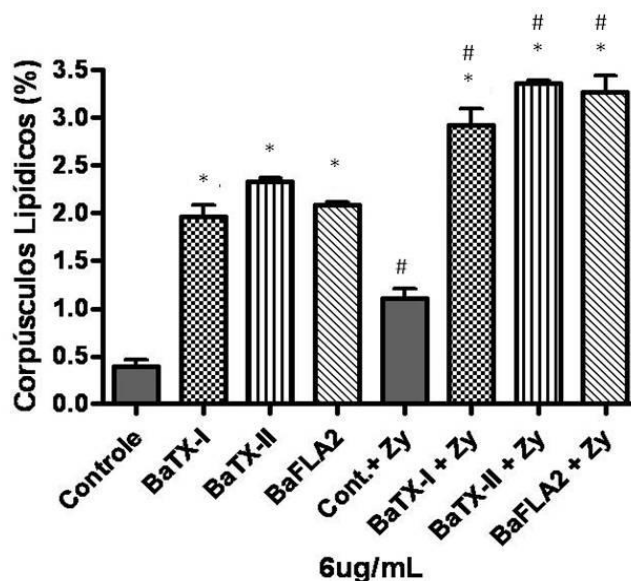


Fig 8 - Efeito das toxinas sobre a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1, submetidos ou não à fagocitose. Os macrófagos tiveram sua concentração ajustada para $2 \times 10^5/\text{mL}$ e foram colocados em lamínulas de vidro para adesão por 2 horas. Em seguida, foram incubados com RPMI (controle), BaTX-I, ou BaTX-II ou BaFLA₂ ($6 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 1 hora. Após este período, uma parte das lamínulas foi incubada com partículas de zimosan opsonizadas por 40 minutos, para o processo de fagocitose. Ao final desta etapa, todas as lamínulas foram coradas com tetróxido de ósmio. Foram contadas um total de 50 células e o número de corpúsculos lipídicos presentes no interior de cada macrófago foi quantificado. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados. * $p < 0,05$ em relação ao controle. # $p < 0,05$ em relação às células que não fagocitaram (ANOVA).

4.7-Efeito das toxinas sobre a produção de TNF- α em macrófagos J774A.1

Para avaliar se as fosfolipases BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ são capazes de estimular a produção de TNF- α em macrófagos, as células foram incubadas com RPMI (controle), ou INF- γ (1 μ g/mL- controle positivo), ou com as três toxinas na concentração de 6 μ g/mL, por um período de 4 horas. Logo após, o sobrenadante foi coletado e a determinação da produção de TNF- α foi avaliada por ensaio imunoenzimático. Como mostra a figura 9, as toxinas BaTX-I e BaFLA₂, ambas enzimaticamente ativas, induziram um aumento na produção de TNF- α pelos macrófagos, embora a BaTX-I tenha sido mais eficiente que a BaFLA₂ na manutenção deste efeito. A toxina BaTX-II, inativa enzimaticamente, não induziu nenhum aumento significativo na produção de TNF- α no tempo estudado.

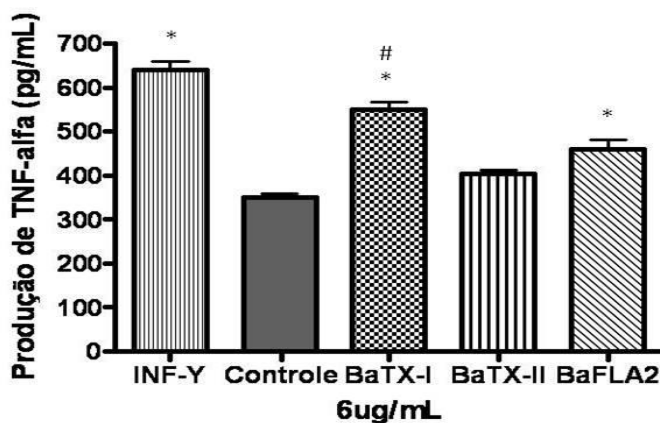


Fig 9 - Efeito das toxinas sobre a produção de TNF- α em macrófagos J774A.1. Os macrófagos tiveram sua concentração ajustada para 2×10^5 /mL e foram incubados com RPMI (controle), ou INF- γ (1 μ g/mL- controle positivo), ou BaTX-I, ou BaTX-II ou BaFLA₂ (6 μ g/mL) por 4 horas. Após este período, o sobrenadante foi coletado e a produção de TNF- α foi avaliada por ensaio imunoenzimático. Os dados representam a média \pm EPM de 3 experimentos independentes, em dias alternados. * $p < 0,05$ em relação ao controle. # $p < 0,05$ em relação à BaTX-III (ANOVA).

DISCUSSÃO

A superfamília das fosfolipases é constituída por grupos de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações acil-éster, na posição *sn*-2 de diferentes fosfolipídios liberando ácidos graxos. Devido à esta capacidade de hidrólise, estas enzimas desempenham papel importante em vários processos biológicos através da formação de segundos mensageiros, transdução de sinais, homeostasia de membranas celulares, digestão de lipídios, defesa do hospedeiro e produção de mediadores lipídicos. Além disso, as FLA₂s participam de diversas patologias de caráter inflamatório, como a asma brônquica, rinite alérgica, artrite reumatóide, pancreatite aguda, dentre outras.

Estas enzimas são encontradas abundantemente na natureza, estando presentes em altas concentrações nos venenos de abelhas, vespas e serpentes, sendo um dos principais fatores que contribuem para os efeitos proinflamatórios induzidos por estes venenos.

Apesar deste grupo de enzimas ser um dos mais estudados atualmente, os mecanismos que envolvem sua participação em processos inflamatórios ainda não estão claros. Dessa forma, estudos voltados para o esclarecimento da ação das fosfolipases são considerados de extrema importância, principalmente no que se refere às FLA₂s de venenos de serpentes.

Sabe-se que a inflamação é freqüentemente associada ao envenenamento causado por serpentes do gênero *Bothrops* (ROSENFELD, 1971; GUTIÉRREZ *et al.*, 1981; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). A atividade inflamatória aguda se deve à ação de um conjunto de frações do veneno botrópico, bioquimicamente heterogêneas, com especificidades diversas, responsáveis pelos fenômenos locais (CARDOSO *et al.*, 2009). Tal atividade leva à formação de edema e envolve a participação de vários mediadores endógenos como a histamina, serotonina, eicosanóides, fator ativador de plaquetas, citocinas e óxido nítrico (TREBIEN & CALIXTO, 1989; CHAVES *et al.*, 1995; BARROS *et al.*, 1998; ZAMUNER *et al.*, 2001). Além do edema é possível observar a presença de células inflamatórias como demonstrado por diferentes autores (GUTIÉRREZ *et al.*, 1986b; FLORES *et al.*, 1993; LOMONTE *et al.*, 1993; BURIGO, *et al.*, 1996; ZAMUNER *et al.*, 2001; FARSKY *et al.*, 1997). Devido à grande quantidade de FLA₂s encontradas nestes venenos, a hipótese de participação das mesmas nestes efeitos fica fortalecida.

Baseando-se nisso, o presente estudo avaliou o efeito de três sFLA₂, BaTX-I (Asp-49) básica, BaTX-II (Lys-49) básica e BaFLA₂ (Asp-49) ácida, isoladas a partir do veneno da serpente *Bothrops atrox*, sobre a funcionalidade de macrófagos murinos da linhagem J774A.1. O intuito foi verificar se as toxinas são capazes de induzir eventos proinflamatórios, como aumento da fagocitose e da produção de ânion superóxido, aumento do volume lisossomal e formação de corpúsculos lipídicos. Para isso, avaliou-se, primeiramente, a atividade citotóxica destas fosfolipases. O ensaio de viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripan demonstrou que as toxinas nas concentrações de 1,5, 3 e 6 µg/mL não apresentaram nenhum efeito citotóxico sobre os macrófagos no período estudado, 1 hora. Assim, para a realização dos demais experimentos propostos, a concentração mais alta, 6 µg/mL, foi escolhida.

Corroborando os dados presentemente obtidos, LOMONTE *et al.* (1989), mostraram que duas fosfolipases A₂ isoladas do veneno da serpente *Bothrops asper* (MT-II e MT-III), exercem efeitos citotóxicos apenas em altas concentrações. Ainda, no estudo realizado por ZULIANI *et al* (2005), ficou evidenciado que macrófagos peritoneais murinos elicitados por tioglicolato, incubados com concentrações menores que 25 µg/mL das toxinas MT-II e MT-III, por um período de uma hora, não tiveram sua viabilidade comprometida. O estudo mostrou ainda que a toxina MT-III (Asp-49), enzimaticamente ativa, é mais tóxica que a toxina MT-II (Lys-49), enzimaticamente inativa. Essa diferença na capacidade citotóxica dependente da atividade enzimática não foi observada em nossos estudos, visto que as três FLA₂ utilizadas apresentaram o mesmo efeito sobre os macrófagos. Ainda, cabe ressaltar que o caráter ácido ou básico destas toxinas também não influenciou nos resultados.

Por ser considerado um fagócito profissional, o macrófago possui um papel importante na resposta imune inata contra patógenos invasores, na resolução da inflamação e na manutenção da homeostasia dos tecidos. Esta célula possui um papel central na reação inflamatória, produzindo agentes microbicidas e exercendo a sua principal função: fagocitose. Para que este processo ocorra de forma eficaz, os macrófagos precisam aderir sobre um substrato e, então, modificar sua morfologia celular, adquirindo uma forma mais achatada. Essa etapa de adesão é muito importante para que o macrófago consiga espalhar e aumentar sua superfície de contato com a partícula a ser fagocitada. Dessa forma, nosso

estudo avaliou o efeito das três fosfolipases sobre a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos. Os resultados obtidos demonstraram que as toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ não afetaram a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos no período estudado.

A literatura reporta que as FLA₂s possuem um importante papel na adesão celular. O uso de inibidores de FLA₂s, como parabromofenacila, reduziu a adesão de monócitos e afetou a expressão de MAC-1 em neutrófilos (JACOBSON & SCHRIER, 1993; LEFKOWITH *et al.*, 1992), bem como o espriamento destas células (GALKINA *et al.*, 1996). Ainda, ZHU *et al.* (1999) evidenciaram que uma cFLA₂ pode mediar a adesão de eosinófilos á moléculas ICAM-1 ou VCAM-1, através de beta-2-integrina CD11b/CD18. Por outro lado, duas enzimas não-tóxicas, com alta atividade de FLA₂, isoladas a partir do veneno da serpente *Cerastes cerastes*, denominadas CC- FLA₂ I e CC- FLA₂ II, inibiram a migração e a adesão de células tumorais de fibrosarcoma e mieloma ao fibrinogênio e à fibronectina, por um mecanismo dose-dependente (ZOURAI-KESSENTINI *et al.*, 2009). BAZAA *et al.* (2005), evidenciaram a ação de uma outra FLA₂, chamada de MVL- FLA₂, desta vez isolada a partir de *Macrovipera lebetina transmediterranea*. Neste estudo, a enzima também foi capaz de inibir a migração e a adesão de células tumorais ao fibrinogênio e á fibronectina, mas não ao colágeno tipo I. Tais efeitos foram mediados pela inibição específica de $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 6$ integrinas. Estes dados mostram que as integrinas podem constituir um alvo específico para o mecanismo de ação das fosfolipases em células de linhagem tumoral. A despeito da capacidade de descolamento, nossos dados mostraram que as células continuaram viáveis após incubação com as toxinas na concentração e tempo estudados, permanecendo aderidas à superfície da placa.

Cabe ressaltar que para que o processo de fagocitose ocorra de forma eficaz, os macrófagos precisam aderir sobre um substrato para posteriormente modificar sua morfologia celular de uma forma redonda para uma forma achatada (TAYLOR, 2002).

O processo de fagocitose é extremamente complexo, podendo ser mediado por vários receptores como o receptor para a porção Fc da IgG (FcγRs), o receptor de manose (MR), o receptor para β-glucano (Dectin-1) e o receptor do complemento tipo 3 (CR3). O receptor FcγR é especializado no reconhecimento e captação de partículas opsonizadas por IgG. Já o CR3 reconhece partículas revestidas por fragmentos C3b/C3bi do sistema

complemento. O processo de opsonização favorece grandemente a fagocitose, pois facilita a interação entre o macrófago e a partícula a ser fagocitada. Nesse sentido, avaliou-se o efeito das FLA₂s sobre a fagocitose via receptor de complemento, utilizando-se partículas de zimosan opsonizadas. Os dados obtidos mostram que apenas a toxina BaTX-II, uma Lys-49, induziu significativo aumento na taxa de fagocitose via receptor de complemento. As demais toxinas, BaTX-I e BaFLA₂, ambas Asp-49, não afetaram este processo. O caráter ácido ou básico também parece não afetar este parâmetro. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por ZULIANI *et al.* (2005). Os autores demonstraram que a miotoxina MT-II, uma Lys-49, isolada do veneno de *Bothrops asper*, também aumenta consideravelmente a fagocitose via receptor de complemento, enquanto a miotoxina MT-III, uma Asp-49, estimula apenas a fagocitose via receptores de manose em macrófagos murinos elicitados. Assim, pode-se dizer que a atividade enzimática parece não ser essencial para o aumento da capacidade fagocítica via CR3, visto que as fosfolipases cataliticamente inativas foram as únicas capazes de afetar este parâmetro. Apesar dos estudos realizados, o mecanismo pelo qual as FLA₂ Lys-49 ativam o processo de fagocitose ainda não foi esclarecido. Há duas hipóteses para a ação destas toxinas enzimaticamente inativas. Uma delas é a interação da enzima com o receptor, levando à sua internalização. A outra é que estas fosfolipases possuem a capacidade de induzir perturbações na membrana celular, o que ativa vias de sinalização, culminando com a fagocitose. Dessa forma, estudos adicionais para o esclarecimento destas argumentações são necessários para elucidar o mecanismo de ação destas enzimas, o que as torna extremamente interessantes do ponto de vista científico.

Concomitantemente ao processo de fagocitose, ocorre um aumento no metabolismo oxidativo dos macrófagos, denominado “burst” respiratório, mediado pelo complexo enzimático NADPH oxidase. O alto consumo de O₂ associado à rápida ativação da NADPH oxidase, desencadeia a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs), tais como ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), potentes agentes microbicidas (BABIOR, 1973). Assim sendo, este estudo avaliou a ação das FLA₂ sobre a produção de ânion superóxido pelos macrófagos. Os resultados mostraram que as três toxinas aumentaram significativamente a liberação de superóxido em comparação ao controle não estimulado. O aumento foi similar ao observado nas células incubadas com

PMA, controle positivo. Não houve diferença entre as fosfolipases Asp-49 e Lys-49, sugerindo que a atividade catalítica pode não ser essencial para a produção de superóxido. Quanto ao caráter ácido ou básico, evidenciou-se, mais uma vez que, o mesmo parece não contribuir para este efeito. De acordo com o estudo realizado por ZULIANI *et al.* (2005), as toxinas MT-II e MT-III isoladas do veneno de *Bothrops asper* induzem a liberação de H_2O_2 , um outro reativo intermediário do oxigênio produzido a partir do ânion superóxido. Neste caso, a MT-III teve ação mais acentuada que a MT-II. Este aumento na capacidade de produção de agentes microbicidas induzido pelas fosfolipases pode ser considerado um dos pontos essenciais para o desenvolvimento do intenso processo inflamatório local verificado nos envenenamentos botrópicos.

É possível que o aumento do índice fagocítico esteja associado a um aumento também no compartimento endocítico, contribuindo para o aumento da capacidade microbicida dos macrófagos, haja vista que a desestabilização das membranas lisossomais envolve aumento na fusão de lisossomos e fagolisossomos, frequentemente associado ao estresse derivado da ação de agentes pró-oxidantes e de condições patológicas. Nesse sentido, foram realizados experimentos para avaliar se as toxinas são capazes de induzir um aumento do volume lisossomal. Os macrófagos foram incubados com as fosfolipases por 15, 30 e 60 minutos. Avaliando-se o decurso temporal do efeito das três toxinas, pode-se verificar que o aumento do compartimento endocítico dos macrófagos ocorre de maneira bastante acentuada nos primeiros 15 minutos após a estimulação, e que a atividade enzimática não é essencial para este efeito, visto que apenas a BaTX-II, inativa enzimaticamente, conseguiu alterar este parâmetro. As fosfolipases enzimaticamente ativas, BaTX-I e BaFLA₂, só foram capazes de induzir o aumento do volume lisossomal após 30 minutos de incubação. Neste período, a BaTX-II também foi eficiente na manutenção deste efeito. Após serem estimulados por 1 hora com as fosfolipases, os macrófagos não apresentaram nenhuma alteração em seu compartimento endocítico. Isso pode sugerir que após o período de 30 minutos, a ação das toxinas diminui e o volume lisossomal das células retorna ao seu nível basal. Apesar da atividade lipolítica de FLA₂ frequentemente afetar diversas estruturas de membranas, incluindo a dos lisossomos, em nossos estudos, a atividade enzimática parece não interferir no aumento do volume lisossomal, assim como o caráter ácido ou básico destas enzimas. Estudos realizados por

BURLANDO *et al.* (2002), mostraram que uma cFLA₂ cálcio-independente é um dos agentes responsáveis pela desestabilização da membrana lisossomal induzido por estradiol. A desestabilização da membrana leva á fusão do lisossomo com outras organelas, como o endossoma. Tal processo, como evidenciado por MAYORGA *et al.* (1993), envolve a ação de uma FLA₂. Assim sendo, os dados sugerem que estas enzimas podem induzir típicas modificações morfológicas e funcionais no sistema vacuolar dos lisossomos.

Dados da literatura mostram que na vigência de processos inflamatórios, os leucócitos, por estarem ativados, desenvolvem grandes quantidades de organelas denominadas corpúsculos lipídicos. Estas organelas compartimentalizam diversos grupos de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídios e na sinalização celular, além de conterem os complexos enzimáticos COX e 5-LO, e ainda AA, cFLA₂, MAPK e PI3K (BOZZA *et al.*, 1996; 1997). Diversos achados têm indicado que a principal função dos corpúsculos lipídicos consiste na metabolização de AA durante a inflamação, acarretando a formação de eicosanóides, importantes mediadores inflamatórios. Desse modo, a ação das toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ sobre a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos J774A.1 foi avaliada. Os dados obtidos mostram que as três fosfolipases foram capazes de aumentar o número de corpúsculos lipídicos presentes nos macrófagos. Esta ação ocorreu de maneira independente da atividade enzimática e não foi observada nenhuma diferença estatística entre as toxinas. A literatura mostra, ainda, que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas que podem interagir com outras estruturas dentro da célula, tais como o proteassoma, o fagossoma e o autofagossoma (VAN MEAN *et al.*, 2005; FUJIMOTO *et al.*, 2008). Assim sendo, avaliou-se a ação destes corpúsculos na vigência de ação das toxinas em macrófagos submetidos ao processo de fagocitose. Os resultados mostraram que o número de corpúsculos lipídicos no interior dos macrófagos que fagocitaram foi maior que o encontrado nos macrófagos que não foram submetidos ao processo. A toxina BaTX-II foi um pouco mais eficiente que as demais na manutenção deste efeito. Em relação á atividade enzimática, as três fosfolipases foram capazes de induzir estes eventos independentemente da capacidade catalítica. Mais uma vez, não houve diferença em relação ao caráter ácido ou básico destas enzimas. Os dados sugerem que a ativação de receptores do complemento durante a fagocitose, estimula, de algum modo, a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos, induzido também pela ação de

sFLA₂s. A participação dos corpúsculos lipídicos na fagocitose de partículas de látex foi demonstrada por VAN MANEN *et al.* (2005). Este estudo evidenciou que os corpúsculos lipídicos estão associados ao fagossoma, em fagócitos profissionais e que a incubação destas células com AA e partículas de látex, leva ao acúmulo de corpúsculos lipídicos próximo ao fagossoma. Isto sugere que o AA liberado pode ser utilizado para auxiliar na maturação do fagossoma formado. O mecanismo de formação dos corpúsculos lipídicos ainda não está claro. Devido à presença de cFLA₂ no interior destas organelas, com capacidade de desencadear a liberação de AA (YU *et al.*, 1998), sugere-se a participação da mesma em sua formação. Assim, as FLA₂s, além de liberarem o AA dos fosfolipídios de membrana, podem hidrolisar a fosfatidilcolina e liberar o liso-PAF, precursor do fator ativador de plaquetas (PAF). Dados da literatura apontam que este mediador inflamatório, com atividade agregadora de plaquetas, está envolvido em vias de sinalização que favorecem a formação de corpúsculos lipídicos e a liberação de mediadores como o LTC₄ e PGE₂ (BOZZA *et al.*, 1997). Ainda, BAKER *et al.* (1990) mostraram que o etanol reduz a fagocitose de partículas de zimosan não-opsonizado, levando a uma diminuição também da concentração de PAF. Isto sugere que o PAF também pode ter participação em processo de fagocitose. Outras proteínas como MAPK, ERK1, ERK2, PI3K, PKC, também podem estar envolvidas no processo de formação dos corpúsculos lipídicos (YU *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002). Estudos adicionais para se verificar o papel dos corpúsculos lipídicos durante o processo de fagocitose e os mecanismos de formação destas organelas são necessários, haja visto a importância das mesmas para a funcionalidade dos leucócitos durante reações inflamatórias.

Além do aumento no número de corpúsculos lipídicos, os macrófagos ativados apresentam um aumento na produção de citocinas com importantes funções em respostas inflamatórias. Uma delas é o TNF- α , um potente mediador inflamatório capaz de induzir proliferação de fibroblastos e a produção de outras citocinas, além de ativar leucócitos e estimular a geração de espécies reativas do oxigênio. Dessa forma, avaliou-se a ação das três fosfolipases, BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂, sobre a produção de TNF- α em macrófagos J774A.1. Os dados obtidos mostraram que as toxinas BaTX-I e BaFLA₂ induziram um significativo aumento na produção de TNF- α pelos macrófagos após 4 horas de incubação, sendo que BaTX-I foi um pouco mais eficiente que a BaFLA₂ na indução da produção

desta citocina. Ambas as toxinas são Asp-49, enzimaticamente ativas, sendo que a primeira é ácida e a última é básica. Os resultados mostram também, que a BaTX-II Lys-49, inativa enzimaticamente, não induziu nenhum aumento na produção desta citocina no período estudado. Estes dados estão de acordo com o estudo realizado por ZULIANI *et al.* (2005b), no qual a miotoxina com estrutura de FLA₂, MT-III Asp-49, isolada da serpente *B. asper*, induziu um aumento na produção de TNF- α no lavado peritoneal de camundongos após 1 hora de injeção. A MT-II, uma Lys-49, induziu um pequeno aumento neste parâmetro apenas após 6 horas de incubação. O aumento na produção de citocinas, particularmente o TNF- α , pode ser regulado pelo aumento na produção de espécies reativas do oxigênio, em um mecanismo dependente do NF-kB. LOMONTE *et al.* (1993) e ZULIANI *et al.* (2005a), demonstraram a habilidade destas miotoxinas isoladas da serpente *B. asper* induzirem um aumento significativo na produção de H₂O₂, sugerindo que altos níveis deste reativo do oxigênio podem ter um importante papel na regulação da produção de TNF- α .

A despeito da atividade catalítica, os resultados obtidos demonstram que as três fosfolipases foram capazes de induzir eventos proinflamatórios. Apesar de sua pouca atividade enzimática, as FLA₂ Lys-49 são altamente miotóxicas e conseguem afetar a integridade das membranas celulares.

No que se refere ao caráter ácido ou básico destas enzimas, não ficou evidenciada nenhuma diferença na atividade das fosfolipases utilizadas neste estudo. Grande parte das FLA₂ isoladas a partir de venenos botrópicos são proteínas básicas. As FLA₂ ácidas ainda estão sendo estudadas, mas dados da literatura mostram que estas enzimas podem induzir diversos efeitos farmacológicos como agregação plaquetária e hipotensão arterial. As fosfolipases ácidas, em geral, não são miotóxicas, mas este efeito pode aparecer em menor escala em comparação às fosfolipases básicas, que possuem intensa atividade miotóxica. Entretanto, as fosfolipases ácidas possuem maior atividade catalítica (ROSEMBERG, 1983). Estudos complementares com estas enzimas, tanto de caráter ácido quanto de caráter básico, ainda são necessários para que se possa determinar uma possível correlação entre os efeitos tóxicos e o potencial farmacológico das mesmas.

CONCLUSÕES

- ✓ As toxinas BaTX-I Asp-49 básica, BaTX-II Lys-49 básica e BaFLA₂ Asp-49 ácida, nas concentrações de 1,5, 3 e 6µg/mL, não apresentaram efeitos citotóxicos sobre os macrófagos murinos da linhagem J774A.1;
- ✓ As toxinas BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂ na concentração de 6µg/mL não afetaram a capacidade de adesão e descolamento dos macrófagos;
- ✓ Apenas a BaTX-II, Lys-49, enzimaticamente inativa, na concentração de 6µg/mL foi capaz de induzir o aumento da fagocitose via receptor de complemento pelos macrófagos;
- ✓ As três fosfolipases, BaTX-I, BaTX-II e BaFLA₂, na concentração de 6µg/mL, induziram significativo aumento da produção de ânion superóxido pelos macrófagos. O aumento foi similar ao observado nas células estimuladas com PMA, utilizado como controle positivo;
- ✓ Apenas a BaTX-II, Lys-49, induziu um aumento do volume lisossomal dos macrófagos J774A.1 após 15 minutos de incubação. Após 30 minutos, as três toxinas induziram este efeito. Após 1 hora de incubação este efeito não foi observado em nenhuma das toxinas na concentração estudada;
- ✓ As três fosfolipases, na concentração de 6µg/mL, aumentaram a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos J774A.1, submetidos ou não ao processo de fagocitose via receptor de complemento;
- ✓ As toxinas BaTX-I e BaFLA₂, ambas Asp-49, na concentração de 6µg/mL, foram capazes de induzir um aumento significativo na produção de TNF- α pelos macrófagos J774A.1 no período estudado, 4 horas. A BaTX-II, Lys-49, não foi capaz de induzir este efeito na concentração e no período estudados;

- ✓ A atividade enzimática de FLA₂ parece não ser essencial para estes efeitos, visto que todas as toxinas foram capazes de induzir eventos proinflamatórios;
- ✓ O caráter ácido ou básico das fosfolipases utilizadas neste estudo parece não contribuir para os efeitos observados.

REFERÊNCIAS

ABE, A.; HIRAOKA, M.; SHAYMAN, J. A. Positional specificity of lysosomal phospholipase A₂. **Journal of Lipid Research**, v 47, p. 2268-2279, 2006.

ABE, A; SHAYMAN, J. A. Purification and Characterization of 1-O-acylceramide synthase a novel phospholipase A₂ with transacylase activity. **J Biol Chem**, 273:8467-74. 1998.

ADEREM, A.; UNDERHILL, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, 17: 593-623, 1999.

ALLEN, L. A.; ADEREM, A. - Mechanisms of phagocytosis. **Curr. Opin. Immunol.**, 8: 36-40, 1996.

AMBRÓSIO, A.L.B.; NONATO, M.C.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; ARNI, R. WARD, R.J.; OWNBY, C.L.; DE SOUZA, D.H.F.; GARRAT, R.C. A molecular mechanism for Lys49 PLA₂ activity based ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.** v.280, n.8, p. 7326-35, 2005.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.; FULY, A.L.; CORREA, F.M.; ROSA, J.C.; GREENE, L.J.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** 64, 723-32, 2002.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipase A₂ in *Bothrops* snake venoms: effects of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of toxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie** 82:755-763, 2000.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Induction of ciclooxigenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Adv. Pharmacol.**, 35:27-79, 1996.

BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURCNUITTE, J.T. - Biological defense mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential agent. **J. Clin. Invest.**, **52**: 741-4, 1973.

BABIOR, B. M. NADPH Oxidase: an update. **Blood**, **93**: 1464-76, 1999.

BAKER, R.C.; TUCKER, M.; CLAY, K.L. Ethanol inhibits zymosan-stimulated and enhances nonstimulated platelet-activating factor production in a clonal macrophage cell line. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 252: 1028-33, 1990.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M.V.; DENNIS, E.A. Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Lett.**, 531: 2-6, 2002.

BALSINDE, J.; SHINOHARA, H.; LEFKOWITZ, L.J.; JOHNSON, C.A.; BALBOA, M.A.; DENNIS, E.A. Group V phospholipase A(2)-dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. **J. Biol. Chem.**, 274:25967-70, 1999.

BALSINDE, J.; BIANCO, I.D.; ACKERMANN, E.J.; CONDE-FRIEBOES, K.; DENNIS, E.A. Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and pspspholipid remoldeong in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **92**, 8527-8531, 1995.

BARBOSA, A.M.; do AMARAL, R.O.; TEIXEIRA, C.F.; HYSLOP, S.; COGO, J.C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, 42 (5): 515-23, 2003.

BARROS, S.F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVOCH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokyne release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Med. Inflam.**, 7: 339-346, 1998.

BAZAA, A.; MARRACKCHI, N.; EL AYEB, M.; SANZ, M.; CALVETE, L. Snake venoms: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *Cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. **Proteomics** 5, 4223-4235, 2005.

BECK, S.; LAMBEAU, G.; SCHOLZ-PEDRETTI, K.; GELB, M. H.; JANSSEN, M. J.; EDWARDS, S. H.; WILTON, D. C.; PFEILSCHIFTER, J.; KASZKIN, M. Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A2 (sPLA2)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA2 and peroxisome proliferators-activated receptor alpha activation. **J. Biol. Chem.**, v.278, n.32, p. 29799-29812, 2003.

BEILS, W.J.; WELLER, P.F.; PEPPERCORN, M.A.; GALLI, S.J.; DVORAK, A.M. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF alpha in colonic Crohn's disease. **J. Leukoc. Biol.** 58:284-298, 1995.

BOGATCHEVA, N.V.; SERGEEVA, M.G.; DUDEK, S.M.; VERIN, A.D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvasc. Res.**, v.69, n.3, p.107-127, 2005.

BOTTING, R.M. Inhibitors cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J. Physiol. Pharmacol.** s.5, p. 113-124, 2006. Review.

BOUGNERES, L.; HELFET, J.; TIWARI, S.; VARGAS, P.; CHANG, B.H.J.; CHAN, L.; CAMPISI, L.; LAUVAU, G.; HUGUES, S.; KUMAR, P.; KAMPHORST, A.O.; DUMENIL, A.M.L.; NUSSENZWEIG, M.; MACMIKING, J.D.; AMIGORENA, S.; GUERMONPREZ, P. A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC Class I in dendritic cells. **Immunity**, **31**, 232-244, 2009.

BOWTON, D.L.; SEEDS, M.C.; FASANO, M.B.; GOLDSMITH, B.; BASS, D.A. Phospholipase A₂ and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatic. **Am J Respir Crit Care Med.** **155**: 421-5, 1997.

BOZZA, P.T.; MELO, R.C.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. **Pharmacol. Ther.** 113:30-49, 2007.

BOZZA, P.T.; YU, W.; WELLER, P.F. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2:135-40, 1997.

BOZZA, P.T.; PAYNE, J.L.; MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 93: 11091-6, 1996.

BROWN, W.J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. **Traffic**, 4: 214-21, 2003.

BUCKLEY, T.L.; BRAIN, S.D. Functional interactions between inflammatory mediators, in the microcirculation and relevance of neurogenic components. The Handbook of Immunopharmacology, Immunopharmacology of the Microcirculation. San Diego, **Academic Press**, p. 63-76, 1994.

BURIGO, A.C.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pharmacological profile of rat pleurisy induced by *Bothrops jararaca* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, 48: 106-11, 1996.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ Biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, 23:49-59, 2009.

BURLANDO, B.; MARCHI, B.; PANFOLI, I.; VIARENGO, A. Essential role of Ca²⁺-dependent Phospholipase A₂ in estradiol-induced lysosome activation. **Am. J. Physiol. Cell.** 283: 1461-1468, 2002.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K.; WATANABE, Y. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain: possible role in the febrile response. **Brain Res.** v. **697**, n 1-2, 187-196, 1995.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WE, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica. **Sarvier Ed.** São Paulo, 2003.

CARON, E.; HALL, A. - Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**, **282**: 1717-21, 1998.

CASTRO, R.C.; LANDUCCI, E.C.T.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Leukocyte recruitment induced by type II phospholipase A₂ in the rat pleural cavity. **Toxicon**, **38**:1773-85, 2000.

CAUGHEY, G.E.; POULIOT, M.; CLELAND, L.G.; JAMES, M.J. Regulation of tumor necrosis factor alfa and interleukin-1 beta synthesis by tromboxane A₂ in non-adherent human monocytes. **J. Immunol**, **158**:351-8, 1997.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 99:13926-31, 2002.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V.H.; GUTIÉRREZ, J.M. Pharmacological modulation of oedema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, 36: 1861-1869, 1998.

CHAVES, F.; BARBOSA, M.; GUTIERREZ, J.M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo) in mice. **Toxicon**, 33; 31-39, 1995.

CHEN, J.S.; GREENBERG, A.S.; WANG, S.M. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW264.7 macrophages. **J. Cell. Biochem**. 86:784-791, 2002.

CHILTON,F.H.; AVERILL, F.J.; HUBBARD, W.C.; FONTEH, A.N.; TRIGGIANI, M.;

LIU, M.C. Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. **Journal of Experimental Medicine**, Vol 183, 2235-2245, 1996.

CIRINO, G. - Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A₂, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Pharmacol.**, 55: 105-11, 1998.

COX, D.; TSENG, C.C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement for PI3 kinase in pseudopod extension. **J. Biol. Chem.**, **274**: 1240-7, 1999.

D'ÁVILA, H.; ALMEIDA, P.E.; ROQUE, N.R.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. **Infect. Immunol.** **75**:1507-11, 2007.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J.C.; SPENCER, P.J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R.C.; OLIVA, M.L.V.; DA SILVA, M.B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; GUARNIERI, M.V. BE-I-PLA2 a novel acidic PLA2 from *Bpithrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.** **v.72**, p.377-83, 2006.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **Trends Biochem Sci**, 22:1-2, 1997.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 18, p. 13057-13060, 1994. Review.

DIAZ, C.; GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; GENE, J.A. The effect of myotoxin isolated from *Bothrops asper* snake venom on multilamellar liposomes: anticoagulant and myotoxic activities. **Biochem. Biophys. Acta** 1070 455-460, 1991.

DINARELLO, C.A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **J. Infect. Dis.**, 163: 1177-84, 1991.

DOWNEN, M.; ZHAO, M.L.; LEE, P.; WEIDENHEIN, K.M.; DICKSON, D.W.; LEE, S.C. Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 58:12-21, 1999.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, S.; VAN DE PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J.** 12:1063, 1998.

DVORAK, A.M.; HAMMEL, I.; SCHULMAN, E.S.; PETERS, S.P.; MACGLASHAN, D.W.J.; PYRE, K.; HARVEY, V.S.; GALLI, S.J.; LICHTENSTEIN, L.M. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. **J. Immunol.** 131, 2965 – 2976, 1983.

FABIA, R.; AR RAJAB, A.; WILLEN, R.; ANDERSSON, S. **Bengmark, Br. J. Surg.** **80**: 1199-1204, 1993.

FARSKY, S.H.P.; COSTA-CRUZ, J.W.M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C.F.P. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom. *In vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, 35: 185-93, 1997.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. - Lipoxygenase- derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, **31**: 1551-9. 1993.

FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A.; DOIG, M.V.; SHIPLEY, M.E.; SMITH, M.J.H. Leukotriene B: a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, **286**, **264**, 1980.

FORSTERMANN, U.; GATH, I.; SCHWARZ, P.; CLOSS, E.I.; KLEINERT, H. - Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. **Biochem. Pharmacol.**, **50**: 1321-1332, 1995.

FREMONT, D. H.; ANDERSON, D. H.; WILSON, I. A.; DENNIS, E. A. Crystal structure of phospholipase A₂ from Indian snake venom cobra a trimeric association. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**:342-46, 1993.

FUJIMOTO, T.; OHSAKI, Y.; CHENG, J.; SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y. **Histochem. Cell. Biol.** 130, 263-279, 2008.

FUJIOKA, D.; SAITO, Y.; KOBAYASHI, T.; YANO, T.; TEZUKA, H.; ISHIMOTO, Y.; SUZUKY, N.; YOKATA, Y.; NAKAYAMA, T.; OBATA, J.E. Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A₂- deficient mice. **Circulation**, **117**:2977-2985, 2008.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; FERN, M.; ISIDORO, L.F. Isolation and Characterization of a New Myotoxic Acidic Phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* Snake Venom. **Toxicon**, 65: 850-61, 2007.

FULY, A.L.; SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, JR.; GUIMARÃES, J.A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D-49 Phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**. **v.86**, p. 731-739, 2004.

FULY, A.L.; CALIL-ELIAS, S.; ZINGALI, R. B.; GUIMARÃES, J. A.; MELO, P. A. Myotoxic activity of an acidic phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* (Bushmaster) snake venom. **Elsevier Science**, 2000.

GALKINA, S.I.; SUDINA, G.F.; MARGOLIS, L.B. Regulation of intracellular pH by PLA₂ and protein kinase C upon neutrophil adhesion to solid substrata. **FEBS** **393**:117-120, 1996.

GAMBERO, A.; THOMAZZI, S.M.; CINTRA, A.C.; LANDUCCI, E.C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. **Toxicon.**, 44:473-81, 2004.

GANTNER, B.N.; SIMMONS, R.M.; CANAVERA, S.J.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D.M. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. **J. Exp. Med.**, 197: 1107-17, 2003.

GARCIA-LEME, J. - Hormones and inflammation. **Florida Boca, Raton**, p.238, 1989.

GHOSH, M. Properties of the group IV phospholypase A₂ family. **Prog. Lipid. Res.** 45, 487-510, 2006.

GOKE, B.; MEYER, T.; LOTH, H.; ADLER, G.; ARNOLD, R. **Klin. Wochenschr.** 67: 131-135, 1991.

GORDON, S.; FRASIER, I.; NATH, D.; CLARKE, S. Macrophages in tissues and in vitro. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, n. 1, p. 25-32, 1992.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH-oxidase: a structural perspective. **Biochem J.**, 386 (Pt 3): p. 401-16, 2005.

GUTIERREZ, J.M. Understandign snake venoms: 50 years of research in Latin America. **Rev. Biol. Trop.** 50, 377-394, 2002.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venom. In: KINI, R.M. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: structure, fuction and mechanisms. **Chichester**, pp. 321-352, 1997.

GUTIÉRREZ, J.M. & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Memorias Instituto Butantan**, 51: 211-223, 1989.

GUTIERREZ, J.M.; CHAVES, F.; CERDAS, L. Inflammatory infiltrate in skeletal muscle injected with *Bothrops asper* venom. **Rev. Biol. Trop.**, 34: 209-19, 1986a.

GUTIERREZ, J.M.; LOMONTE, B.; CHAVES, F.; MORENO, E.; CERDAS, L. Pharmacological activities of a toxic phospholipase A isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Com. Biochem. Physiol.**, v:84, p. 159-164, 1986b.

GUTIERREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ROJANS, E.; ARROYO, O.; PORTILHA, E. Neutralization of local effects of *Bothrops asper* venom by polyvalent antivenin. **Toxicon**, 19: 493-500, 1981.

HAAPAMAKI, M.M.; GRONROOS, J.M.; NURMI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T.J. Gene expression of group II phospholipase A₂ in intestine in Crohn's disease. **Am. J. Gastroenterol.**, 94: 713-20, 1999.

HAAPAMAKI, M.M.; GRONROOS, J.M.; NURMI, H.; SODERLUND, K.; PEURAVUORI, H.; ALANEN, K.; NEVALAINEN, T.J. Elevated group II phospholipase A₂ mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. **Clin. Chem. Lab. Med.**, 36: 751-5, 1998.

HANASAKI, K.; YOKOTA, Y.; ITOH, T.; ISHIZAKI, J.; ARITA, H. J. **Biol. Chem.** 272: 32792-32797, 1997.

HARRIS, J.B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle.- In: HARVEY, A.L.; ed. Snake Toxins., New York, **Pergamon Press**, 1991.

HENDERSON, J.W.R.; CHI, E.Y.; BOLLINGER, J.G.; TIEN, Y.T.; YE, X.; CASTELLI, L.; RUBTSOV, Y.P.; SINGER, A.G.; CHIANG, G.K.; NEVALAINEN, T. Importance of group X secretory phospholipase A₂ in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma mouse. **J. Exp. Med.**, 204:865-877, 2007.

HIBBS, J.B.; TAINTOR, R.R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E.M.. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 30: 87-94, 1989.

HIEFINGER-SCHINDLBECK, R.T.; DASSER, C.; HUBNER-PARAJSZ, C.;

HOFFMAN, G.E.; GUDER, W.G. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** 31, 211-215, 1993.

HIETARANTA, A.; KEMPPAINEN, E.; POULAKKAINEN, P. Extracellular phospholipase A₂ in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. **Pancreas**, 18: 385-391, 1999.

HIRATA, T.; USHIKUBI, F.; KAKIZUKA, A.; OKUMA, M.; NARUMYIA, S. Two thromboxane A₂ receptor isoforms in human platelets. **J. Clin. Invest**, 97: 949-956, 1996.

HUBBARD, A.; ROTHLEIN, R. - Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radic. Biol. Med.**, 28: 1379-1386, 2000.

ISCHIROPOULOS, H.; NELSON, J.; DURAN, D.; AL-MEHDI, A. - Reactions of nitric oxide and peroxynitrite with organic molecules and ferrihorseradish peroxidase: interference with the determination of hydrogen peroxide. **Free Radic. Biol. Med.**, 20: 373-381, 1996.

ISHIZUKA, T.; SUZUKI, K.; KAWAKAMI, M.; HIDAKA, T.; MATSUKI, Y.; NAKAMURA, H. Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. **Eur. J. Pharmacol.**, 312:367-77, 1996.

JACOBSON, P.B.; SCHRIER, D.J. **J. Immunol.** 151, 5639-5652, 1993.

JAMES, M.J.; CAUGHEY, G.E.; PENGLIS, P.S.; DEMASI, M.; CLELAND, L.G. Eicosanoid production by monocytes: does COX-2 contribute to a self-limiting inflammatory response?. **Inflammation Research**, 50: 249-253, 2001.

JENEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.** 20:197-216, 2002.

JENEWAY, C.A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. **Immunol. Today**, 13: 11-16, 1992.

KANASHIRO, M.M.; ESCOCARD, R.D.C.M.; PETRTSKI, J.H.; PRATES, M.V.; ALVES, E.W.; MACHADO, O.L.T.; da SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Biochemical and biological properties of phospholipase A₂ from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochem. Pharmacol.** **64**:1179-86, 2002.

KARGMAN, S.; CHARLESSON, S.; CARTWRIGHT, M.; FRANK, J.; RIENDEAU, D.; MANCINI, J.; EVANS, J.; O'NEILL, G. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. **Gastroenterology**, **v.111**, n.2, p. 445-454, 1996.

KERRIGAN, A.M.; BROWN, G.D. C-type lectins and phagocytosis. **Immunobiology**, **214** (7):562-575, 2009.

KIKAKAWA, U.; KISHIMOTO, A.; NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. **Annu Rev Biochem.** **58**:31-44, 1989.

KIM, D.K.; FUKUDA, T.; THOMPSON, B.T.; COCKRILL, B.; HALES, C.; BONVENTRE, J.V. **Am. J. Physiol.** **269**, 109-118, 1995.

KING, C.C.; JEFERSON, M.M.; THOMAS, E.L. Secretion in inactivation of mieloperoxidase by isolated neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, **61**: 293 – 302, 1997.

KINI, R.M. Phospholipase A₂ – A complex Multifunctional Protein Puzzle. In: **Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Structure, Function and Mechanism**. R. Manjunatha Kini, ed., New York, John Wiley & Sons, 1997, p.1.

KINI, R.M.; EVANS, H.J. A model to explain to pharmacological effects of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, **v.27**, n6, p. 613-635, 1989. Review.

KUIPERS, O.P.; VAN DEN BERG, C.J.; VERHEIJ, H.M.; DE HAAS, G.H. Probing the mechanism of phospholipase A₂ with the aid of recombinant techniques. **Adv. Exp. Med. Biol.**, **279**: 65-84, 1990.

KULINSKY, V.I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochemistry**, v.72, n6, p. 595-607, 2007. Review.

KUNDU, G.C.; MUKHERJEE, A.B. Evidence that porcine pancreatic phospholipase A₂ via its high affinity receptor stimulates extracellular matrix invasion by normal and cancer cells. **J. Biol. Chem.** **272**: 2346-53, 1997.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, 15: 680-685, 1970.

LAINÉ, V.J.; GRASS, D.S.; NEVALAINEN, T. Protection by group II phospholipase A₂ against *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.** **162**:7402-08, 1999.

LAMBETH, J. D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radic. Biol. Med.**, 43(3), p. 319-31, 2007.

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; TOYAMA, M.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Inflammatory edema induced by the Lys-49 phospholipase A₂ homologue piratoxin-I in the rats and rabbit. **Biochem Pharmacol** **59**: 1289-94, 2000.

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEPREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. **Eur. J. Pharmacol**, **343**:257-63, 1998.

LENNARTZ, M.R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 31: 415-430, 1999.

LENNARTZ, M.R.; LEFKOWITH, J.B.; BROMLEY, F.A.; BROWN, E.J. Immunoglobulin G-mediated phagocytosis activates a calcium-independent, phosphatidylethanolamine-specific phospholipase. **J. Leukoc. Biol.**, 54: 389-398, 1993.

LIM, K.G.; WAN, H.C.; BOZZA, P.T.; RESNICK, M.B.; WONG, D.T.; CRUIKSHANK, W.W.; KORNFIELD, H.; CENTER, D.M.; WELLER, P.F. Humas eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants IL-16 and RANTES. **J. Immunol.** **156**, 2566-2570, 1996.

LIN, M.K.; FAREWELL, V.; VADAS, P.; BOOKMAN, A.A.; KEYSTONE, E.C.; PRUZANSKI, W. Secretory phospholipase A₂ as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. **J Rheumatol.** **23**(7):1162-6, 1996.

LIN, L.L.; WARTMANN, M.; LIN, A.Y.; KNOPF, J.L.; SETH, A.; DAVIES, R.J. cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP Kinase. **Cell** **72**:269-278, 1993.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, **42**:885-901, 2003.

LOMONTE, B.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J.M.; RAMIREZ, G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godmann's pit viper). **Toxicon**. **28**: 75–81, 1990.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L.A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. **Inflammation**, **17**: 93-105, 1993.

LOMONTE, B.; CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102**: 325-29, 1992.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, **27**: 725-33, 1989.

MAKELA, A.; ATERNBY, B.; KUUSI, T.; PUOLAKKAINEN, P.; SCHRODER, T. **Scand J. Gastroenterol.** **25**, 944-950, 1990.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piratoxin-I. **Toxicon**, **33**:615-26,

1995.

MARTIN, S.; PARTON, R.G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. **Nat. Rev. Mo. Cell. Biol.** **7**: 373-378, 2006.

MAYORGA, L.S.; COLOMBO, M.I.;LENNARTZ, M.; BROWN, E.J.; RAHMAN, K.H.; WEISS, R.; LENNON, P.J.; STHAL, P.D. Inhibition of endosome fusion by phospholipase A₂ inhibitors points to a role for PL A₂ in endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **90**: 10255-10259, 1993.

McINTOSH, J.M.; GOMASHCHI, F.; GELB, M.H. **J. Biol. Chem**, **270**, 3518-3526, 1995.

MORA, R.; VALVERDE, B.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M. A Lys49 phospholipase A(2) homologue from Bothrops asper snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. **Toxicon**, **45**: 651-60, 2005.

MUÑOZ, N.M.; MELITON, A.Y.; ARM, J.P.; BONVENTRE, J.V.; CHO, W.; LEFF, A.R. Deletion of secretory group V phospholipase A₂ attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice. **J. Immunol.** **179**:4800-4807, 2007.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂ minireview. **J. Biochem.** **131**:285-292, 2002.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; ATSUMI, G.; INOUE, K.; KUDO, I. Regulatory functions of phospholipase A₂. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 225-283, 1997. Review.

MURAKAMI, M.; NAKATANI, Y.; HARA, N.; KUDO, I; INOUE, K. Role of phospholipase A₂ in mast cell activation and function. In: **Phospholipase A₂ in Clinical Inflammation: Molecular Approaches to Pathophysiology**, v.5, p. 93-124, 1995.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research.** **40** 325 – 438, 2001.

NAGASE, T.; UOZUMI, N.; ISHII, S.; KUME, K.; IZUMI, T.; OUCHI, Y. Acute lung injury by sepsis and acid aspiration: a key role for cytosolic phospholipase A₂. **Nat. Immunol.** 1: 42-49, 2000.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, **420**:846-52, 2002.

MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T. Acute wound healing. An overview. *Clin Plastic Surg*, 30:1-12, 2003.

MAJNO G. & JORIS, C. Cells, Tissues and Disease . **Oxford Univ. Press**, 2004.

OKA, S.; ARITA, H. Inflammatory factors stimulate expression of group II Phospholipase A₂ in rat cultured astrocytes: two distinct pathways of the gene expression. **J. Biol. Chem.** **265**, 9956-60, 1991.

OLIVEIRA, A.H.; GIGLIO, J.R.; ANDRIÃO-ECARSO, A.S.; ITO, R.J.; WARD, A. pH induced dissociation of the dimeric from a Lys-49 phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺ independent membrane damaging activity. **Biochemistry**, **40**:6912-6920, 2001.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine-49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, **37**:411-445, 1999.

PACHECO, P.F.; BOZZA, A.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.; WELLER, P.F.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. **J. Immunol.**, 169: 6498-6506, 2002.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 11-17: 524-526, 1987.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON, W.R. Leukotrienes, **N. Engl. J. Med.** 357, 1841-1854, 2007.

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; FARLEY, S.R. Assays for mensuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. Technique in Fish Immunolog7. V.4, p. 93-100, 1995.

POBER, J.S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Rev. Immunol**, **7**, 803-815, 2007.

POLIOUT, M.; GILBERT, C.; BORGEAT, P.; POUBLE, P. E.; BOURGOIN, S.; CREMION, C.; MACLOUF, J.; McCOLL, S. R.; NACCACHE, P. H. Expression and activity of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in agonist-activated human neutrophils. **FASEB J.**, v. 12, n. 12, p.1109-1123, 1998.

PORTANOVA, J.P.; ZHANG, Y.; ANDERSON, G.D.; HAUSER, S.D.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; GREGORY, S.A.; ISAKSON, P.C. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hypearlgesia, and interleukin 6 production in vivo. **J. Exp. Med.** , v.184, n.3, p. 883-891, 1996.

QU, X.D.; LERHER, R.I. **Infect. Immun.** **66**, 2791-2797, 1998.

QUIN, M.T.; PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D. Lisophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human mocytes and its potential role in atherogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v 85, n8, p. 2805-09, 1998.

RABINOVITCH, M. Macrophage spreading *in vitro*. In: Van FURTH, R.; ed. **Mononuclear Phagocytes in Immunity Infection and Pathology**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1975, p. 369-85.

RADMARK, O.; SAMUELSSON, B. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. **BBRC**, **396**: 105-110, 2010.

RAMONER, R.; PUTZ, T.; GANDER, H.; RAHM, A.; BARTSCH, G.; SCHABER, C.; THURNHER, M. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A2. **Blood**, 105: 3583-7, 2005.

REEVES, E.P.; LU, H.; JACOBS, H.L.; MESSINA, C.G.; BOLSOVER, S.; GABELLA, G.; POTMA, E.O.; WARLEY, A.; ROES, J.; SEGAL, A.W. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K^+ influx. **Nature**, **416**, 291-297, 2002.

RIZZO, M.T.; NGUYEN, E.; ALDO-BENSON, M.; LAMBEAU, G. Secreted phospholipase A2 induces vascular endothelial cell migration. **Blood**, Vol. 96, No. 12, pp. 3809-3815, 2000.

ROBBINS, R.A.; GRISHAM, M.B. Molecules in focus. Nitric oxide. Int. **J. Biochem. Cell Biol.**, 29: 857 – 60, 1997.

ROBENEK, M.J.; SEVERS, N.J.; SCHLATTMANN, K.; PLENZ, G.; ZIMMER, K.P.; TROYER, D.; ROBENEK, H. Lipids participation caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplets biogenesis. **FASEB J.**, 18:866-68, 2004.

ROGERS, N.C.; SLACK, E.C.; EDWARDS, A.D.; NOLTE, M.A.; SCHULZ, O.; SCHWEIGHOFFER, E.W.; WILLIAMS, D.L.; GORDON, S.; TYBULEWICZ, V.L.; BROWN, G.D. Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. **Immunity**, **22**:507-517, 2005.

ROHN, T.T., NELSON, L.K.; SIPES, K.M.; SWAIN, S.D.; JUTILA, K.L.; QUINN, M.T. Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, **65**: 59-70; 1999.

ROPER, R.L.; PHIPPS, R.P. Prostaglandin E2 and cAMP inhibit B lymphocyte activation and simultaneously promote IgE and IgG1 synthesis. **J. Immunol**, **149**:2984-91, 1992.

ROSENBERG, P.; CONDREA, E.; RAPUANO, B.E.; SOONS, K.R.; YANG, C.C. Dissociation of pharmacological and enzymatic activities of snake venom phospholipases A2 by modification of carboxylate groups. **Biochem. Pharmacol.** **v.32**, p.3525-30, 1983.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous Animals and Their Venoms**, v.2, p. 345-403 (Burchel, W. & Buckley, E. E. ed) New York: Academic Press, 1971.

SANCHES-MEJORADA, G.; ROSALES, C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. **J. Leukoc. Biol.**, 63: 521-533, 1998.

SARAU, H.M.; FOLEY, J.J.; SCHIMIDT, D.B.; MARTIN, L.D.; WEBBS, E.F.; TZIMAS, M.N.; BRETON, J.J.; CHABOT-FLETCHER, M.; UNDERWOOD, D.C.; HAY, D.W.; KINGSBURY, W.D.; CHAMBERS, B.A.; PENDRAK, I.; JAKAS, D.R.; SATHE, G.M.; VAN HORN, S.; DAINES, R.A.; GRISWOLD, D.E. In vitro and in vivo pharmacological characterization of SB 201993, an eicosanoid-liked LTB₄ receptor antagonist with anti-inflammatory activity. **Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. **61**, n.1, p. 55-64, 1999.

SATAKE, Y.; DIAZ, B.; BALESTRIERI, B.; LAM, B.K.; KANAOKA, Y.; GRUSBY, M.J.; ARM, J.P. Role of group V phospholipase A₂ in zimosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. **J. Biol. Chem.** **279**, 16488-94, 2004.

SAWADA, H.; MURAKAMY, M.; ENOMOTO, A.; SHIMBARA, S.; KUDO, I. **Eur. J. Biochem.** **263**, 826-835, 1999.

SCHALWIJK, C.G.; PFEILSCHIFTER, J.; MARKI, F.; VAN DER BOSCH, H. – Interleukin – 1, tumor necrosis factor and forskolin stimulate the synthesis and secretion of group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. **Biochem, Biophys. Res Commun.** **174**: 268-75, 1991.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; BROWNING, J.L.; ROSA, J.J.; GELB, M.; SIGLER, P.B. Structure of free and inhibited human secretory phospholipase A₂ from inflammatory exsudate. **Science**, **254**: 1007-1010, 1991.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.; SIGLER, P.B. Interfacial catalyses: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, **250**: 1541-1566, 1990.

SERHAN, C.N.; OLIW, E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. **J. Clin. Invest.** **107**: 1481-89, 2001.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004. Review.

SIX, D. A.; DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Elsevier Science**, 2000.

SMITH, W.S.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. **Annu. Rev. Biochem.** v. **69**, p. 145-182, 2000. Review.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venom: structure-function, relationship. **Curr. Org. Chem.** **8**, 1677-1690, 2004a.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R.G.; FRANÇA, S.C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R.J.; ARANTES, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochem Biophys Res Commun.** **302**(2):193-200, 2003.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, S.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I from *Bothrops moojeni* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** **373**, 7-15, 2000a.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.M.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys-49 phospholipase A₂ homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **CBP, Part C** **142**:371-381, 2006.

STADEL, J.M.; HOYLE, K.; NACLERIO, R.M.; ROSHAK, A.; CHILTON, F.H. Characterization of phospholipase A2 from human nasal lavage. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 11: 108-13, 1994.

STEADMAN, R.; PETERSON, M.M.; WILLIAMS, J.D. CD11b/CD18-dependent stimulation of leukotriene B4 synthesis by human neutrophils is synergistically enhanced by tumor necrosis factor alpha and low dose diacylglycerol. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, 28:771-6, 1996.

STUART, L.M.; EZEKOWITZ, R.A.B. Phagocytosis: Elegant Complexity. **Immunity**, 22:539-550, 2005.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochem Biophys Res Commun**, 338(1), 677-86, 2005.

TAKAKUA, T.; ENDO, S.; INADA, K.; KASAI, T.; YAMADA, Y.; OGAWA, M. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 98: 43-52, 1997.

TAYLOR, P.R.; BROWN, G.D.; REID, D.M.; WILLMENT, J.A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S.; WONG, S.Y. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. **J. Immunol.**, 169: 3876-82, 2002.

TEIXEIRA, C.F.P.; CHAVES, F.; ZAMUNER, S. R.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; CRUZ-HOFLING, M. A.; FERNANDES, I.; GUTIERREZ, J. M. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. **Int. J. Pathol.**, 86: 107-115, 2005.

THUNNINSEN, M.M.G.M.; AB, E.; KALK, K.H.; DRETH, J.; DIJKSTRA, B.W.; KUIPERS, O.P.; DIJKMAN, R.; DE HASS, G.H.; VERHEIJ, H.M.N. X-ray structure of phospholipase A₂ complexed with a substrate-derived inhibitor. **Nature**, 347:689-91, 1990.

TREBIEN, H.A.; CALIXTO, J.B. Pharmacological evaluation of rat paw edema induced by *Bothrops jararaca* venom. **Agents and Actions**, 26: 292-300, 1989.

UOZUMI, N.; KUME, K.; NAGASE, T.; ISHII, S.; NAKATANI, N.; TASHIRO, F.; KOMAGATA, Y.; MAKI, K.; IKUTA, K.; OUCHI, Y. Role of cPLA₂ in allergic response and parturition. **Nature**, **390**: 618-22, 1997.

VADAS, P.; PRUZANSKI, W. Biology Disease: Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. **Laboratory Investigation**, 55: 391-404, 1986.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A₂ and their receptors and binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, 31: 59-70, 2000.

VALENTIN, E.; GHOMASHCHI, F.; GELB, M.H.; LAZDUNSKI, M.; LAMBEAU, G. J. **Biol. Chem.** **274**, 31195-31202, 1999.

VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. In electrophoretic study on phospholipases A₂ isoenzymes in the venoms of Central American crotaline snakes. **Toxicon**, 30: 815-823, 1992.

VAN DEN BERGH, C.J.; SLOTBOOM, A.J.; VERHEIJ, H.M.; DE HAAS, G.H. - The role of aspartic acid-49 in the active site of PLA₂. **Eur. J. Biochem.**, **176**: 353-57, 1988.

VAN MANEM, H.J.; KRAAN, Y.M.; ROOS, D.; OTTO, C. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 102: 10159 – 64, 2005.

VIDARSSON, G.; VAN DE WINKEL, J. G. Fc receptor and complement receptor-mediated phagocytosis in host defence. **Curr Opin Infect Dis.** 11(3):271-8, 1998.

VISHWANATH, B.S.; KINI, R.M.; GOWDA, T.V. Characterization of three edema-inducing phospholipase A₂ enzymes from Habu venom and their interaction with the alkaloid aristocholic acid. **Toxicon**, 25: 501-15, 1987.

VON ALLMEN, C.E.; SCHIMITZ, N.; BAUER, M.; HINTON, J.H.; KURRER, M.O.; BUSER, R.B.; GWERDER, M.; MUNTWILER, S.; SPARWASSER, T.; BEERLI, R.R.; BACHMAN, M.F. Secretory PLA2-IIID is an effector molecule de CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell. **PNAS**, v.106, n.28, p. 11673-68, 2009.

WAN, H.C.; MELO, R.C.; JIN, Z.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **FASEB J.**, 21: 167-178, 2007.

WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. **FASEB J.**, 18: 790-804, 2004.

WEINRAUCH, Y.; ELSBACH, P.; MADSEN, L.M.; FOROMA, A.; WEISS, J. J. **Clin. Invest.** **97**, 250-257, 1996.

WELLER, P.F.; RYON S.W.; PICARD, S.T.; ACHERMAN, S.J.; DVORAK, A.M. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. **J Cell Biol** 113:137 –146, 1991a.

WERY, J.P.; SCHEVITZ, R.W.; CLAWSON, D.K.; BOBBITT, J.L.; DOW, E.R.; GAMBOA, G.; GOODSON, T.; HERMANN, R.B.; KRAMER, R.M.; McCLURE, D.B.; MIHELICH, E.D.; PUTMAN, J.E.; SHARP, J.D.; STARK, D.H.; TEATER, C.; WARRICK, M.W.; JONES, N.D. Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A₂ at 2.2 Å resolution. **Nature**, 352: 79-82, 1991.

WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest.** 80: 617, 2000.

YU, W.; CASSARA, J.; WELLER, P.F. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. **Blood**, **95**: 1078-1085, 2000.

YU, W.; BOZZA, P.T.; TZIZIK, D.M.; GRAY, J.P. CASSARA, J.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. **Am. J. Pathol.**, 152:759-69, 1998.

ZAMUNÉR, S.R.; GUTIÉRREZ, J.M.; MUSCARÁ, M.N; TEIXEIRA, S.A.; TEIXEIRA, C.F.P. - *Bothrops asper* e *Bothrops jaracaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. **Toxicon**, v.39, p.1505-1513, 2001.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; LUIS, J.; KARRAY, A.; KALLECH-ZIRI, O.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; LORET, E.; BEZINE, S.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Two purified and characterized PLA₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion. **Toxicon**, 53:444-453, 2009.

ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.M.; ZAMUNER, S.R.; GUTIERREZ, J.M.; TEIXEIRA, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 secretory phospholipases A₂: Role of catalytic activity. **Toxicon**, 45: 335-346, 2005a.

ZULIANI, J.P.; GUTIERREZ, J.M.; CASAIS E SILVA, L.L.; SAMPAIO, S.C.; TEIXEIRA, C.F.P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 Phospholipases A₂. **Toxicon**, 46: 523-32, 2005b.

ANEXOS

Soluções utilizadas

Meio de cultura RPMI pH 7,2 (Solução Estoque)

RPMI-1640	10,4 g
Hepes	2,383 g (9,9 mM)
Água destilada	1000 mL

Solução de RPMI pH 7,2 (Solução de Uso)

Meio RPMI.....	89 mL
Soro Fetal Bovino.....	10 mL
Gentamicina (100 µg/mL).....	100 µL
L-glutamina.....	1,0 mL

Solução de Glutamina (2mM)

L-glutamina.....	0,292 g (1,998mM)
PBS.....	q.s.p 1000 mL

Tampão Fosfato-salina (PBS, pH 7,2)

NaH ₂ PO ₄ H ₂ O.....	2,03g (14,71mM)
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O.....	11,49g (80,94mM)
NaCL.....	85g (1,454M)
Água destilada.....	1000 mL

Solução de Azul de Tripan (0,1%)

Azul de Tripan X-10.....	0,1 g (0,104Mm)
Água destilada.....	100 mL

Solução de Safranina

Safranina 1%1g (2,850Mm)
 Ácido acético.....100 mL

Solução de Extração

Ácido acético glacial 1%.....500 µl
 Etanol 30 %.....15 mL
 Água destilada.....34,5 MI

Solução Estoque de Vermelho Neutro

Vermelho neutro 2%20 mg
 DMSO.....1 mL

Tampão Cacodilato pH 7,4

Cacodilato.....16 g
 Água destilada.....100 mL

Solução de Tiocarboxidrazida

Tiocarboxidrazida 1%250 mg
 Água destilada.....25 mL

Solução de GIEMSA

GIEMSA 0,1%5 mg
 Água destilada.....50 mL

Drogas e reagentes

Acetato de forbol miristato - PMA (Sigma Chemical Company, EUA), Ácido acético glacial (Merck Germany), Azul de tripan (Biotec, Brasil), DMSO (Biotec, Brasil), Etanol (Sigma Chemical Company, EUA), Gentamicina (Hipolabor), Giemsa (Newprov, Brasil), Kit para dosagem de TNF- α (R&D DuoSet), Glicerol (Merck, Germany), Hepes (Sigma Chemical Company, EUA), L-glutamina (Sigma Chemical Company, EUA), LPS (Sigma Chemical Company, EUA), Metanol (Sigma Chemical Company, EUA), NBT (Sigma Chemical Company, EUA), RPMI-1640 (Sigma Chemical Company, EUA), Safranina (Sigma Chemical Company, EUA), Soro Fetal Bovino (Cultilab), Zymosan (Sigma Chemical Company, EUA).